

**BIOGENESE VON CYTOCHROM C:
ZUM MECHANISMUS DER SPEZIFISCHEN ERKENNUNG
UND BINDUNG VON APOCYTOCHROM C
AN MITOCHONDRIEN**

HELMUT KÖHLER

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554610_0046

BIOGENESE VON CYTOCHROM C:
ZUM MECHANISMUS DER SPEZIFISCHEN ERKENNUNG UND BINDUNG
VON APOCYTOCHROM C AN MITOCHONDRIEN

Dissertation
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
HELMUT KÖHLER
aus Eschede

München 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. W. Neupert

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juni 1986

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. Dr. Neupert, gilt mein umfassender Dank für sein ständiges motivierendes Interesse an Thema und Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Dr. B. Hennig danke ich für wichtige Anregungen und die Vermittlung vieler experimenteller Prinzipien zu Beginn dieser Arbeit.

Diese Dissertationsschrift sei aber zudem eine gute Erinnerung an zahlreiche Diskussionen und fruchtbare Zusammenarbeit besonders mit Helmut Freitag, Don Nicholson, Berndt Schmidt, Manfred Schleyer, Rosemary Stuart, Richard Zimmermann, Craig Zwizinski und auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Neupert.

Den Mitarbeitern des Institutes für Physiologische Chemie danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung. Zum Gelingen dieser Arbeit haben wesentlich beigetragen Beatrice Böning, Marlis Krammer, Leopoldine Sander und insbesondere Gabriele Zimmermann.

ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CCCP	Corbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
cpm	counts per minute
DE(AE)-	Diethylaminoethyl-
dpm	departs per minute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethyläther)-tetraacetat
GTP	Guanosintriphosphat
kD	kilo-Dalton
KPP	Kaliumphosphatpuffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$)
2-ME	2-Mercaptoethanol
MG/MW	Molekulargewicht
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
NADH	Nikotinamiddinukleotid (red. Form)
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (red. Form)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
mRNS	messenger-Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SME	Saccharose-MOPS-EDTA
SMEP	Saccharose-MOPS-EDTA-PMSF
TEA	Triethanolamin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

INHALTSVERZEICHNIS

	SEITE
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	7
2.1 Kultivierung von <i>Neurospora crassa</i>	7
2.2 Homogene radioaktive Markierung des Zellproteins	7
2.3 Ernten von Hyphen, Zellaufschluß und Isolierung von Mitochondrien	7
2.3.1 Aufschluß mit Zelmühle in SMEP-Medium	7
2.3.2 Aufschluß mit Quarzsand in SMEP-Medium	8
2.3.3 Aufschluß mit Quarzsand in Percoll-Medium	8
2.4 Isolierung subzellulärer und submitochondrialer Bestandteile	9
2.4.1 Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation	9
2.4.2 Fraktionierung von Mitochondrien mit Digitonin	9
2.5 Proteinsynthese im zellfreien System von <i>Neurospora crassa</i>	10
2.6 Proteinsynthese im zellfreien System von Kaninchen-Retikulozyten	10
2.6.1 Herstellen der Lysate	10
2.6.2 Isolierung von poly(A ⁺)mRNS	11
2.6.3 Proteinsynthese im Retikulozytenlysat	12
2.7 Proteintransfer in Mitochondrien in-vivo	13

2.8	Proteinisolierung	13
2.8.1	Isolierung von Holocytochrom c	13
2.8.2	Herstellen von Apocytochrom c	15
2.8.3	Isolierung des 20kD-Proteins	16
2.9	Gewinnung spezifischer Antisera	17
2.10	Immunologische Methoden	17
2.10.1	Ouchterlony-Doppeldiffusion	17
2.10.2	Immunpräzipitation	18
2.10.3	"Western Blotting"	20
2.11	Elektrophoretische Methoden	21
2.11.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	21
2.11.2	Zweidimensionale Elektrophorese	23
2.12	Bestimmung von Radioaktivität	23
2.12.1	Flüssigszintillationsmessung	23
2.12.2	Bestimmung von Radioaktivität in Polyacrylamidgelen und "Western Blots"	24
2.13	Radioaktive Markierung von Proteinen durch reduktive Methylierung	24
2.14	Bindungstests für ^{14}C-Apocytochrom c	25
2.14.1	Bindung an isolierte Mitochondrien	25
2.14.2	Bindung an Liposomen	28
2.14.2.1	Präparation von Liposomen und Rekonstitution mitochondrialer Proteine	28
2.14.2.2	Bindungstest mit Liposomen	28
2.15	Bindungstest für die Vorstufe des ADP/ATP-Carriers an isolierte Mitochondrien	29

2.16	Enzymatische Tests	30
2.16.1	Adenylatkinase	30
2.16.2	Fumarase	30
2.16.3	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	30
2.17	Analytische Methoden	31
2.17.1	Proteinbestimmung nach Lowry (1951)	31
2.17.2	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	31
2.18	Chemikalien und Geräte	31
2.18.1	Chemikalien	31
2.18.2	Geräte	32
3.	ERGEBNISSE	34
3.1	Bindung von ^{14}C-Apocytochrom c an isolierte Mitochondrien	34
3.1.1	Scatchard-Analyse der Bindung	34
3.1.2	Proteasesensitivität der hochaffinen Bindung	36
3.1.3	Spezifität der hochaffinen ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung	40
3.1.4	Einflüsse auf die hochaffine ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung an isolierte Mitochondrien	43
3.2	Messung der der hochaffinen spezifischen Apocytochrom-c-Bindung im mitochondrienfreien System	45
3.2.1	Rekonstitution der hochaffinen Bindung in Asolectin-Liposomen	45
3.2.2	Spezifität der liposomalen ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung	47
3.3	Isolierung der Apocytochrom-c-Bindungsaktivität aus Neurospora-Mitochondrien	47

3.4	Charakterisierung des isolierten 20kD-Proteins	54
3.4.1	Bindung von ^{14}C -Apocytochrom c an das 20kD-Protein	54
3.4.2	Isoliertes 20kD-Protein kompetiert um die Bindung von ^{14}C -Apocytochrom c mit isolierten Mitochondrien	58
3.4.3	Subzelluläre Lokalisierung des 20kD-Proteins	59
3.4.4	Submitochondriale Lokalisierung des 20kD-Proteins	63
3.4.5	Die Zahl der hochaffinen mitochondrialen Bindungsstellen für Apocytochrom c korreliert mit dem Gehalt an 20kD-Protein	66
3.4.6	Vergleich der cytoplasmatischen Vorstufe des 20kD-Proteins mit der reifen mitochondrialen Form des Proteins	69
3.4.7	Import des 20kD-Proteins in die Mitochondrien in-vivo	69
3.4.8	Zweidimensionale Gelelektrophorese des isolierten 20kD-Proteins	72
3.4.9	Proteasesensitivität des mitochondrialen 20kD-Proteins	72
3.5	Versuche zur näheren Charakterisierung des Bindungsschrittes von Apocytochrom c im Verlauf des Imports in die Mitochondrien	77
3.5.1	Gebundenes Apocytochrom c ist membranintegriert	77
3.5.2	Die Interaktion des Apocytochrom c mit der Mitochondrienmembran und dem Importrezeptor ist abhängig von der Ionenstärke	77
4.	DISKUSSION	82
4.1	Bindung von Apocytochrom c an Mitochondrien	82
4.1.1	Charakterisierung der hochaffinen spezifischen Bindung	82
4.1.2	Vergleich mit den Bindungsstellen anderer mitochondrialer kernkodierter Vorstufenproteine	84
4.1.3	Biophysikalische Daten über die Interaktion von Apocytochrom c mit synthetischen Lipidmembranen	85

4.2	Das mitochondriale Apocytochrom-c-bindende 20kD-Protein	86
4.2.1	Der Bindungstest im mitochondrienfreien System	86
4.2.2	Charakterisierung des 20kD-Proteins	87
4.2.3	Spezifität und Selektivität der Apocytochrom-c-Bindung an das isolierte 20kD-Protein	88
4.2.4	Ist das 20kD-Protein der Importrezeptor für Apocyto- chrom c?	89
4.3	Hypothetischer Mechanismus des Imports von Apocyto- chrom c in die Mitochondrien	91
5.	ZUSAMMENFASSUNG	93
6.	LITERATURVERZEICHNIS	95

1. EINLEITUNG

Eukaryotische Zellen sind im Gegensatz zu prokaryotischen unterteilt in eine Anzahl von Kompartimenten, die von einer oder mehreren Membranen umgeben sind. Als eine Konsequenz der Entwicklung dieser Kompartimentierung in bestimmte Zellorganellen haben eukaryotische Zellen im Vergleich zu prokaryotischen neue Fähigkeiten entwickeln müssen. Denn jedes dieser durch Membranen abgetrennten Kompartimente besitzt ein ihm eigenes Proteinmuster, das es zu bestimmten spezifischen biochemischen Leistungen in die Lage versetzt. Der exakte und effiziente Einbau jedes Proteins in das ihm eigene Kompartiment ist ein entscheidender Schritt in der Erhaltung und Entwicklung der Zelle. Dieser gerichtete Einbau von Proteinen in Organellen und deren Membranen wirft die Fragestellung auf, wie es Membranen bewerkstelligen, ihre Identität und Kontinuität in Raum und Zeit zu bewahren. Organellenmembranen benötigen deswegen nicht nur Mechanismen, Proteine für das umschlossene Kompartiment spezifisch zu erkennen, sondern auch Mechanismen, diese Proteine über die Lipidmembran(en) zu translozieren.

Alle eukaryotischen Zellen besitzen Mitochondrien (Ernster und Schatz, 1983). Diese Organellen haben zwar ein vollständiges genetisches System (Locker und Rabinowitz, 1979), die darin beinhaltete mitochondriale DNS kodiert allerdings nur für etwa 8 bis 12 verschiedene Polypeptide, die etwa 5 bis 10 Prozent des mitochondrialen Gesamtproteins ausmachen (Schatz und Mason, 1974). Alle übrigen Proteine dieses Zellorganells, mehrere hundert verschiedene, werden im Kern der Zelle kodiert und an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert. Diese Proteine müssen dann in die verschiedenen Kompartimente der Mitochondrien - äußere Membran, Intermembranraum, innere Membran und Matrix - spezifisch transportiert werden.

Für die Biogenese der Proteine anderer Zellorganellen (wie des Zellkerns, des endoplasmatischen Retikulums, des Golgi-Apparates, der Lysosomen, der Vakuolen usw.) sowie der Proteine der Plasmamembran, der Membranen prokaryotischer Organismen und des extrazellulären Raumes muß dies in entsprechender Weise gelten, da die Proteinsynthese ein im Cytoplasma statt-

findender Prozeß ist. Damit ist es notwendig, daß alle Proteine, die nicht im Cytoplasma verbleiben sollen, über Membranen weg an den Ort ihrer Funktion transportiert werden.

Die Phospholipiddoppelschicht von Membranen, die durch hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten wird (Singer und Nicolson, 1972; Tanford, 1978), ist aber undurchlässig für die meisten wasserlöslichen Stoffe. Bereits die Passage von niedermolekularen Verbindungen wie Zucker oder Aminosäuren erfordert spezifische, die Membranpassage ermöglichende Transport- oder Membranproteine (Singer, 1977; Lodish und Rothman, 1979). Es ergibt sich aber daraus die Frage, auf welche Weise Proteine, die nicht im Cytoplasma verbleiben sollen, spezifisch in oder über Membranen transportiert werden. Zwei verschiedene Mechanismen, die am Transport in oder über Membranen beteiligt sind, wurden vorgeschlagen: 1. der cotranslationale Mechanismus, bei dem Membranwahl und Translokation gekoppelte Ereignisse sind, und 2. der posttranslationale Mechanismus, bei dem Vorstufenproteine an freien Polysomen synthetisiert werden und nach vollendeter Synthese über das Cytoplasma zu den entsprechenden Membranen transportiert werden.

Der cotranslationale Mechanismus der Proteintranslokation ist für sekretorische Proteine und letztendlich für einige Proteine der Plasmamembran, des Golgi-Apparates, der Lysosomen und des endoplasmatischen Retikulums gezeigt worden und wird insbesondere durch die sogenannte Signal-Hypothese beschrieben.

Die Signal-Hypothese ist erstmals von Milstein et al. (1972) und von Blobel und Dobberstein (1975) für sekretorische Proteine und dann später auch für Membranproteine von Rothman und Lenard (1977) formuliert worden. Danach wird ein sekretorisches Protein beispielsweise zunächst als größere Vorstufe mit einer aminoterminalen Signal-Sequenz an freien Ribosomen synthetisiert. Diese naszierende aminoterminale Sequenz wird dann durch die sogenannte Signal Recognition Particle (SRP) erkannt und gebunden (Walter und Blobel, 1982), wodurch eine weitere Elongation der Polypeptidkette gestoppt wird. Dieser SRP-Polysomen-Komplex interagiert dann mit einem SRP-Rezeptorprotein, dem sogenannten Docking Protein, einem integralen Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums (Meyer et al., 1982), was unmittelbar den Elongationsblock aufhebt (Gilmore et al. 1982) und zur weiteren Kettenverlängerung des Polypeptides führt. Das anwachsende Peptid passiert daraufhin während der weiteren Synthese die Membran des endoplasmatischen Retikulums,

und die Signal-Sequenz wird im Lumen des endoplasmatischen Retikulums durch eine Signal-Peptidase abgespalten.

Für Mitochondrien - und dies gilt auch für Chloroplasten (Chua und Schmidt, 1979) - ist gefunden worden, daß im Zellkern kodierte Proteine dem post-translationalen Mechanismus gehorchen, das heißt also als Vorstufenproteine an freien Ribosomen vollständig synthetisiert, in das umgebende Cytoplasma abgegeben und über das Cytoplasma zur Zielmembran transportiert werden (Hallermayer et al., 1977; Harmey et al., 1977). Mitochondriale Vorstufenproteine unterscheiden sich in ihrer Konformation von der reifen Form im Organell. Zum einen besitzen einige eine bis zu 10 Kilodalton lange aminoterminal Extension, die dann nach Import in die Mitochondrien von einer matrixlokalisierten Peptidase - der sogenannten Processing Peptidase - abgespalten wird (Daum et al., 1982; Boehni et al., 1983; Mihara et al., 1982; Schmidt et al., 1984). Einige dieser aminoterminalen Extensionen sind in der Zwischenzeit sequenziert worden, und die dabei erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, daß ein Fehlen saurer Aminosäurereste und eine positive Nettoladung ein gemeinsames Charakteristikum dieser Präsequenzen darstellt (Viebrock et al., 1982; Kaput et al., 1982; Horwich et al., 1985). Daß die aminoterminal Präsequenz dazu dienen könnte, für die spezifische Zielrichtung Mitochondrien verantwortlich zu sein, legen die Ergebnisse einiger Arbeiten nahe; bei denen Fusionsproteine zwischen mitochondrialen Präsequenzen und Enzymen wie der β -Galaktosidase (Douglas et al., 1984) oder Dihydrofolatreductase (Hurt et al., 1984a, 1984b) aufgrund der Präsequenz dann korrekt in isolierte Mitochondrien importiert wurden.

Andererseits werden einige der mitochondrialen Vorstufenproteine im Cytoplasma ohne zusätzliche Aminosäuresequenz synthetisiert und ohne proteolytische Prozessierung spezifisch in die Mitochondrien importiert. Als Beispiele seien der ADP/ATP-Carrier (Zimmermann et al., 1979a), das Außenmembranprotein Porin (Freitag et al., 1982) und auch das Cytochrom c (Zimmermann et al., 1979b) genannt. Ein gemeinsames Charakteristikum aller mitochondrialer Vorstufenproteine ist die Tatsache, daß sie selektiv von den Mitochondrien erkannt und importiert werden, wobei ein großer Überschuß an reifem Protein in den Mitochondrien diesen Prozeß in keiner Weise beeinträchtigt. Es muß deshalb ein konformativer Unterschied zwischen dem Vorstufenprotein und dem reifen Protein existieren, der dem mitochondrialen Erkennungssystem erlaubt zwischen den beiden Formen zu unterscheiden. Ex-

perimentelle Evidenzen für diese These sind zum Beispiel darin zu sehen, daß es möglich ist spezifische, nicht kreuzreagierende Antiseren gegen das reife Cytochrom c - auch Holocytochrom c genannt - und seiner cytoplasmatischen Vorstufe - dem Apocytochrom c - zu gewinnen (Korb und Neupert, 1978). Weiterhin hat z.B. der reife ADP/ATP-Carrier die Eigenschaft seinen spezifischen Inhibitor Carboxyatraktylosid zu binden, nicht aber die cytoplasmatische Vorstufe (Zimmermann und Neupert, 1980).

Erkennung von Vorstufenproteinen durch Mitochondrien, der erste Schritt im Verlaufe des gesamten Importprozesses, scheint durch proteinogene Faktoren vermittelt zu werden, die Eigenschaften von Rezeptoren besitzen: Die Bindung von Vorstufenproteine an Mitochondrien ist fest und resistent gegen ein Waschen dieser Mitochondrien mit dem entsprechenden Inkubationsmedium. Die Bindung ist reversibel; gebundene radioaktiv markierte Vorstufenproteine können durch Zugabe überschüssiger nicht-radioaktiver Vorstufen verdrängt werden. Wenn Mitochondrien mit Protease vorbehandelt werden, verlieren sie ihre Eigenschaft Vorstufenproteine zu binden und zu importieren (Gasser et al., 1982; Zwizinski et al., 1984).

Nähere Studien über die Bindung mitochondrialer Vorstufenproteine an ihre spezifische Rezeptoren oder Importstellen von Mitochondrien scheiterten jedoch an der Tatsache, daß für die meisten Vorstufen nicht genügend Mengen rein dargestellt werden können, was eine unerläßliche Voraussetzung für die Durchführung derartiger Studien ist. Nur für zwei mitochondriale Vorstufenproteine gilt diese Limitierung nicht: Eine wasserlösliche Form des Außenmembranproteins Porin konnte präpariert werden aus dem aus Mitochondrien isolierten Protein, welche ähnliche Eigenschaften aufweist wie die native Vorstufe im Cytoplasma (Pfaller et al., 1985). Ebenso konnte die Apo-Form des Cytochrom c chemisch aus der Holo-Form hergestellt und ohne Unterschied zur nativen cytoplasmatischen Vorstufe eingesetzt werden (Korb und Neupert, 1978).

Cytochrom c ist ein außergewöhnlich gut untersuchtes Protein in Bezug auf seine Primär- und Tertiärstruktur, seine Funktion und Topologie in der mitochondrialen Atmungskette (Timkovich, 1979) und schließlich auch seine molekulare Genetik und Evolution (Margoliash, 1973). Dies ist sicherlich ein wichtiger Grund dafür, daß die Untersuchung des molekularen Mechanismus seiner mitochondrialen Assemblierung besonders nützlich erscheint. Folgende Schritte in der Biogenese dieses Proteins sind aufgeklärt (zur Übersicht

siehe Hennig und Neupert, 1983):

- Die Strukturgene von Cytochrom c sind in der Kern-DNS und - zumindest in Hefen - ohne intervenierende Sequenzen enthalten.
- Die mRNA wird an freien Ribosomen translatiert.
- Das primäre Translationsprodukt ist eine extramitochondriale Vorstufe, die keine N-terminalen zusätzlichen Sequenzen aufweist.
- Diese native Vorstufe ist offenbar identisch mit Apocytochrom c, das chemisch unter Abspaltung der Häm-Gruppe aus Holocytochrom c hergestellt werden kann.
- Unter Verwendung spezifischer Antiseren gegen Holo- und Apocytochrom c kann mit *in-vitro*-Translationssystemen der Importweg des Apocytochrom c in die Mitochondrien und die Maturierung zu Holocytochrom c verfolgt werden.
- Apocytochrom c bindet spezifisch an die Mitochondrien.
- Von diesen Bindungsstellen wird Apocytochrom c, ohne daß eine Energietisierung der mitochondrialen Innenmembran notwendig ist, über die Außenmembran transportiert.
- Dabei wird dann die Häm-Gruppe enzymatisch über zwei Thioätherbindungen kovalent angekoppelt. Das Enzym, die Cytochrom-c-Häm-Lyase, kann durch Häm-Analoga reversibel gehemmt werden.
- Das entstandene Holocytochrom c bindet dann an die Außenseite der mitochondrialen Innenmembran.

Weil die Vorstufe des Cytochrom c, das Apocytochrom c, im Gegensatz zu den meisten anderen mitochondrialen Vorstufenproteinen, die nur in zellfreien Systemen mit minimaler Ausbeute synthetisiert werden können, in praktisch unbegrenzten Mengen rein dargestellt werden kann, kann dieser Vorteil genutzt werden, um zu untersuchen

- die Spezifität, Affinität und Identität der postulierten mitochondrialen Rezeptorbindungsstelle für den Import von Apocytochrom c,
- den Mechanismus der Translokation des Apocytochrom c über die Außenmembran der Mitochondrien.
- die Konversion zu Holocytochrom c durch die Cytochrom-c-Häm-Lyase.

Gegenstand dieser Arbeit soll es sein, den wichtigen Schritt der spezifischen Bindung des Apocytochrom c an die Mitochondrien näher zu untersuchen, um damit erstmals konkrete Aussagen über die Existenz und den Mechanismus des Importes durch einen mitochondrialen Rezeptor machen zu können.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Kultivierung von *Neurospora crassa*

Verwendet wurde der Wildtypstamm 74A von *Neurospora crassa* (Fungal Genetic Stock Center No. 262). Die Anzucht der Hyphen wurde wie von Weiss et al. (1970) beschrieben ausgeführt: Für eine 1l-Kultur wurden 940 ml de-ionisiertes Wasser in einer 2l-Steilbrustflasche unter sterilen Bedingungen mit 40 ml 50%iger (w/v) Saccharoselösung (handelsüblicher Zucker, EWG-Qualität I), 20 ml 50fach konzentriertes Minimalmedium nach Vogel und 10 ml Konidien suspension (10^8 Konidien pro ml) versetzt. Die Kulturflaschen wurden mit einem Begasungsaufsatz verschlossen und in einem Wasserbad bei 25°C inkubiert. Begast und umgewälzt wurde mit Druckluft, die durch Filter sterilisiert wurde. Während der Inkubation war der Zuchtraum beleuchtet. Die Hyphen wurden nach 14 bis 16 Stunden geerntet.

2.2 Homogene radioaktive Markierung des Zellproteins

Die Grundmarkierung des Zellproteins mit ^{35}S -Sulfat (25-40 Ci/mg) erfolgte durch Anzucht der Hyphen in sulfatarmen Minimalmedium (0.08 mM MgSO_4) in Gegenwart von 0.5-2 mCi pro Liter (Hallermayer et al., 1977). Im Schnitt wurde damit eine Markierung des mitochondrialen Proteins von 6000-8000 dpm pro μg erzielt.

2.3 Ernten von Hyphen, Zellaufschluß und Isolierung von Mitochondrien

2.3.1 Aufschluß mit Zelmühle in SMEP-Medium

Wurden mehr als 40 g Hyphen (Feuchtgewicht) aufgearbeitet, kam die von Weiss et al. (1970) beschriebene Zelmühle zur Anwendung. Dazu wurden die Hyphen über eine Nutsche auf Filterpapier abfiltriert. Pro g Hyphen (Feuchtgewicht) wurden 3 ml SMEP-Medium (250 mM Saccharose, 10 mM MOPS pH 7.2, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF) zugegeben und in einem Waring-Blender-Mixer für zweimal 15 Sekunden mit der Stufe "low" und dann weitere 15 Sekunden mit

der Stufe "high" bei 4°C homogenisiert. Danach wurde das Homogenat ebenfalls bei 4°C zweimal durch die Zelmühle passiert. Der Durchlauf wurde bei 4°C und 1340 g_{av} in einem Beckman-JA-10-Rotor für 15 Minuten und der dabei resultierende Überstand bei 11000 g_{av} - ebenso in einem JA-10-Rotor - für 30 Minuten zentrifugiert. Das Pellet dieser Zentrifugation enthielt die Mitochondrienrohfraktion und wurde einmal nach Aufnehmen und Homogenisieren in SMEP unter den genannten Bedingungen gewaschen.

Ausbeute: 1.5-2 mg Mitochondrienprotein pro g Hyphen (Feuchtgewicht).

2.3.2 Aufschluß mit Quarzsand in SMEP-Medium

1 g Hyphen (Feuchtgewicht) wurden bei 0-4°C mit 1.5 g gewaschenen Quarzsand und 2 ml SMEP mit Mörser und Pistill für etwa 3 Minuten aufgerieben. Durch zweimalige Zentrifugation für 5 Minuten bei 2000 g_{av} in einem Beckman-JA-20-Rotor wurde ein Zellhomogenat gewonnen, aus dem dann die Mitochondrien durch Zentrifugation für 12 Minuten bei 12000 g_{av} im JA-20-Rotor pelletiert werden konnten.

Ausbeute: 0.5-1 mg Mitochondrienprotein pro g Hyphen (Feuchtgewicht).

2.3.3 Aufschluß mit Quarzsand in Percoll-Medium

Die Isolierung von Mitochondrien durch Dichtegradientenzentrifugation in Percoll wurde in Anlehnung an die von Mickelson et al. (1980) beschriebene Methode durchgeführt: 1 g Hyphen (Feuchtgewicht) wurde bei 0°C mit 1.5 g Quarzsand und 2 ml Percoll-Medium (180 mM KCl, 10 mM MOPS pH 7.2, 2mM EDTA, 1 mM PMSF, 3% (w/v) BSA, 30% (w/v) Percoll) für 3 Minuten mit Mörser und Pistill aufgerieben. Dann wurden weitere 2 ml Percoll-Medium pro g Hyphen zugegeben und die gesamte Suspension 5 Minuten bei 2000 g_{av} in einem Beckman-JA-20-Rotor bei 4°C zentrifugiert. Der dabei anfallende Überstand (Zellhomogenat) wurde direkt für 15 Minuten bei 4°C in einem Beckman-Ti50-Rotor bei 100000 g_{av} ohne Bremse zentrifugiert. Die Mitochondrienbande in dem Percoll-Gradienten konnte in 5-10 % des Gradientengesamt volumens abgenommen werden.

Ausbeute: 1.5-2 mg Mitochondrienprotein pro g Hyphen (Feuchtgewicht).

2.4 Isolierung subzellulärer und submitochondrialer Bestandteile

2.4.1 Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation

Die Mitochondrienrohfraktionen wurden wie in 2.3.1 bzw. 2.3.2 beschrieben durch Zentrifugation des Zellhomogenates für 12 Minuten bei $12000\text{ g}_{\text{av}}$ in einem Beckman-JA-20-Rotor gewonnen. Der Überstand dieser Zentrifugation bildete den sogenannten postmitochondrialen Überstand. Das Mitochondrienpellet wurde dann üblicherweise durch Resuspension in SMEP-Medium und abermaliger Zentrifugation gewaschen. Eine Ultrazentrifugation des postmitochondrialen Überstandes für 1 Stunde bei 4°C und $165000\text{ g}_{\text{av}}$ in einem Beckman-Ti50-Rotor ergab einen postribosomalen Überstand und ein Pellet, das neben Ribosomen auch andere Zellmembranen wie z.B. Plasma- und Mitochondrienmembranen enthält, im folgenden aber vereinfachend ribosomales Pellet genannt werden soll.

2.4.2 Fraktionierung von Mitochondrien mit Digitonin

Dieses Verfahren wurde nach Schmidt et al. (1984) durchgeführt: Mitochondrien, die mit ^{35}S -Sulfat grundmarkiert worden waren (siehe 2.2), wurden unter Verwendung von Quarzsand in SMEP-Medium isoliert. Eine 1%ige (w/v) Stammlösung von Digitonin (rekristallisiert aus Ethanol) in SMEP wurde durch Beschallen (Branson-Sonifier, Mikrospritze) hergestellt. Die erhaltene Lösung wurde innerhalb von 15 Minuten eingesetzt. Mit Hilfe der Bradford-Proteinbestimmung (siehe 2.17.1) wurden die isolierten Mitochondrien auf eine Konzentration von 7 mg pro ml eingestellt. Fünf 100 μl -Aliquots davon wurden mit jeweils 100 μl entsprechend verdünnter Digitoninlösung versetzt, so daß Digitoninendkonzentrationen von 0-0.4 % (w/v) erreicht wurden. Die Proben wurden bei 0°C für 1 Minute inkubiert, dann durch Zugabe von 1.2 ml SMEP verdünnt und auf ein Saccharosekissen von 600 μl 0.7 M Saccharose in 30 mM Tris-HCl pH 7.5 gelegt. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und $48000\text{ g}_{\text{av}}$ in einem Beckman-JA-20-Rotor wurden die Überstände einschließlich des gesamten Saccharosekissens abgenommen. Die Pellets wurden im folgenden dann wieder in 2 ml SMEP resuspendiert. Mitochondriale Pellets und Überstände wurden sodann auf die Gegenwart und Konzentration bestimmter Marker-Proteine hin mittels spezifischer immunologischer und enzymatischer Meßmethoden untersucht.

2.5 Proteinsynthese im zellfreien System von *Neurospora crassa*

Zur Herstellung eines Homogenates für die *in-vitro*-Proteinsynthese nach Korb und Neupert (1978) wurden die Hyphen nach der Ernte mit eiskaltem Waschmedium (30 mM Saccharose, 10 mM $MgCl_2$, pH 7.4 eingestellt mit TEA) gewaschen und trockenfiltriert. Dann wurden die Zellen wie unter 2.3.2 beschrieben in Inkubationsmedium (0.3 M Saccharose, 30 mM KCl, 20 mM KH_2PO_4 , 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 30 mM TEA, 60 mM TEA-HCl, 0.01 % (v/v) 2-ME, 0.25 mM aller L-Aminosäuren außer Leucin, pH 7.4 mit KOH eingestellt) aufgerieben. Durch zweimalige Zentrifugation für 12 Minuten bei 12000 g_{av} (Rotor JA-20) wurden die Mitochondrien entfernt. Zu je 1 ml des postmitochondrialen Überstandes wurden zugegeben:

- 3.6 mg Kreatinphosphat
- 20 μ l $MgCl_2$ (0.2 M, pH 7.4 mit KOH eingestellt)
- 20 μ l GTP (70 mM, pH 7.4 mit KOH eingestellt)
- 20 μ l ATP (0.27 M, pH 7.4 mit KOH eingestellt)
- 10 μ l Kreatinkinase (5 mg per ml in 50 % Glycerol)
- 0.5 ml 3H -Leucin (entsprechend 0.5 mCi, mit KOH neutralisiert).

Anschließend wurde für 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Die Proteinsynthese wurde durch Zugabe von Cycloheximid (Endkonzentration 360 μ M) gestoppt.

2.6 Proteinsynthese im zellfreien System von Kaninchen-Retikulozyten

2.6.1 Herstellen der Lysate

Kaninchen (1.5-2.5 kg) wurden nach Gilbert und Anderson (1971) anämisch gemacht. Am ersten Tag wurde zunächst 1 ml einer Vitaminlösung (0.1 mg Cyanocobalamin, 1 mg Folsäure in physiologischer NaCl-Lösung) in die Muskulatur des Hinterlaufes injiziert und zudem am Rücken subkutan 0.25 ml pro Kilogramm Körpergewicht einer 2.5%igen (w/v) Phenylhydrazinlösung (ebenfalls in physiologischer NaCl-Lösung). Diese Phenylhydrazininjektion wurde an den darauffolgenden 5 Tagen wiederholt. Am achten Tag wurde dann durch Herzpunktion das Blut gewonnen: Durch Injektion in die Ohrvene wurden zunächst 1 ml einer Heparinlösung (5000 U in physiologischer NaCl-Lösung) und dann 1 ml pro Kilogramm Körpergewicht einer Nembutal-Lösung (65 mg/ml in physio-

logischer NaCl-Lösung) verabreicht. Der Brustraum wurde eröffnet und das Herz punktiert. Hierzu und in allen nun folgenden Schritten wurden jeweils autoklavierte Gefäße und Lösungen verwendet. Das Blut wurde nach Hunt und Jackson (1974) auf einer Vorlage von etwa gleichem Volumen einer eiskalten Salzlösung (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 7.5 mM $MgCl_2$, nach dem Autoklavieren supplementiert mit 1250 U Heparin pro 100 ml) in Glaszentrifugenbecher aufgefangen. Zur Isolierung der Retikulozyten wurde 10 Minuten bei 4°C und 2500 g_{av} in einer Tischzentrifuge (Heraeus-Digifuge, Tragringrotor) zentrifugiert und der Überstand und die dem Pellet aufliegende Schicht Leukozyten abgesaugt. Das Pellet wurde dreimal in der oben beschriebenen Salzlösung ohne Heparin gewaschen. Die Retikulozyten wurden in äquivalenten Volumina eiskalten Wassers durch Rühren mit einem Glasstab für 5 Minuten bei 0°C lysiert. Nach Zentrifugation bei 2°C und 20000 g_{av} (JA-20-Rotor) wurden die Überstände in 0.4ml-Portionen in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.6.2 Isolierung von poly(A⁺)mRNS

Die Isolierung erfolgte in Anlehnung an das bei Michel et al. (1979) beschriebene Verfahren. Hyphen aus 16 l Kultur wurden in flüssigen Stickstoff gefroren und im gefrorenen Zustand mit Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Dieses Pulver wurde dann 40g-weise mit 120 g sterilen Quarzsand und 160 ml Extraktionsmedium I/II (1:1) bei Raumtemperatur für 20 Minuten kräftig geschüttelt.

Extraktionsmedium I (Leaver und Ingle, 1971):

- 10 mM Tris-HCl pH 8.2
- 50 mM KCl
- 6 % (w/v) p-Aminosalicylat
- 2 % (w/v) Tri(isopropyl)naphtalinsulfonat

Extraktionsmedium II:

- 50 % (v/v) Phenol-Medium
- 49 % (v/v) Chloroform
- 1 % (v/v) Isoamylalkohol

Phenol-Medium nach Kirby (1968):

- 500 ml Phenol gesättigt mit Tris-HCl pH 8.2
- 75 ml frisch destilliertes m-Kresol
- 0.5 g 8-Hydroxychinolin

Die organischen Phasen wurden durch Zentrifugation bei 11000 g_{av} (Beckman-JA-10-Rotor) und Raumtemperatur von den wässrigen Phasen abgetrennt und die wässrigen Phasen nochmals mit äquivalenten Volumina Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) extrahiert. Mit zwei Volumenanteilen absoluten Ethanol wurde dann die RNS über Nacht bei -20°C ausgefällt, in 66%igem Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 100 mM NaCl resolubilisiert in einer Konzentration von etwa 100 OD pro ml (260 nm). Eine poly(U)-Cellulose-Säule (1.2 x 20 cm) voräquiliibriert in dem oben genannten Puffer wurde zur Isolierung der poly(A^{+})mRNS eingesetzt: Die Gesamt-RNS-Fraktion wurde aufgetragen und die Säule solange mit dem Startpuffer gewaschen, bis am Durchflußphotometer bei 280 nm die Basisabsorption wieder erreicht worden war (Flußrate 1 ml pro Minute). Die RNS wurde mit 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 90 % Formamid (v/v) eluiert, eine Konzentration von 0.2 M Natriumacetat im Eluat eingestellt, und es wurden anschließend wieder wie oben beschrieben mit Ethanol gefällt. Die gewaschene und vakuumgetrocknete poly(A^{+})mRNS wurde dann in sterilem destillierten Wasser gelöst und portionsweise (10 μl entsprechend 1 OD bei 260 nm) bei -80°C aufbewahrt.

2.6.3 Proteinsynthese im Retikulozytenlysat

Die *in-vitro*-Proteinsynthese wurde gemäß dem von Pelham und Jackson (1976) beschriebenen Verfahren durchgeführt: 0.4 ml Retikulozytenlysat wurden langsam in Gegenwart von 12.5 μl Häm (1 mM in 90 % Ethylenglykol (v/v), 2 mM Tris-HCl pH 8.2, 5 mM KCl) aufgetaut. Nach Zugabe von 5 μl 0.1 M CaCl_2 -Lösung und 5 μl Nuclease aus *Staphylococcus aureus* (1 mg/ml) wurde 15 Minuten bei 20°C inkubiert, die Nuclease durch 25 μl 0.1 M EGTA gestoppt, der Ansatz auf 0°C heruntergekühlt und folgende Lösungen zupipettiert:

- 345 μl steriles destilliertes Wasser
- 10 μl Kreatinkinase (5 mg/ml in 50 % (v/v) Glycerin)
- 40 μl Aminosäure-Mix (0.5-3 mM jeder L-Aminosäure mit Ausnahme von Methionin; näheres siehe Pelham und Jackson, 1976)
- 40 μl KCl/MgCl₂ (2 M/10 mM)
- 40 μl Kreatinphosphat (0.2 M)
- 0.5 mCi ^{35}S -Methionin
- 10 μl entsprechend 1 OD poly(A^{+})mRNS

Nach Durchmischung wurde der gesamte Ansatz für 60 Minuten bei 30°C inkubiert, dann auf 0°C heruntergekühlt und eine Endkonzentration von 200 mM unmarkierten Methionin eingestellt. Durch Zentrifugation bei 166000 g_{av} und 2°C in einem Beckman-Ti50-Rotor für 30 Minuten wurde ein postribosomaler Überstand gewonnen, der die translatierten Proteine enthielt.

2.7 Proteintransfer in Mitochondrien in vivo

3g-Portionen Hyphen (Feuchtgewicht) wurden in jeweils 100 ml Kulturmedium (siehe 2.1) resuspendiert und unter ständigem Schütteln zur kontinuierlichen Belüftung auf 7°C abgekühlt. 2 mCi 3H -Leucin wurden zu jedem Ansatz hinzugegeben und weitere 3 Minuten unter Schütteln bei 7°C inkubiert. Dann wurde die cytoplasmatische Proteinsynthese durch Zugabe von jeweils 100 mg Cycloheximid gestoppt. Die Hyphen wurden daraufhin entweder sofort oder aber nach 5-, 12- oder 17-minütiger Weiterinkubation bei 7°C reisoliert und bei 0°C nach der Percoll-Methode (2.3.3) in Zellhomogenat und Mitochondrien fraktioniert. Zusätzlich wurde noch eine Konzentration von 50 μ M CCCP im Homogenisationsmedium eingestellt. Der Import vom 20kD-Protein und - zur Kontrolle - von der Untereinheit 9 der F_0 -ATPase wurden durch Immunpräzipitation aus äquivalenten Volumina Zellhomogenat und Mitochondrien verfolgt.

2.6 Proteinisolierung

2.6.1 Isolierung von Holocytochrom c

Die Isolierung erfolgte in Abänderung des bei Hennig und Neupert (1983) beschriebenen Verfahrens. Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Isolierungsschritte bei 4°C ausgeführt. 1000 g (Feuchtgewicht) gefrorene oder frisch isolierte Hyphen wurden grob zerkleinert in 2-3 l 0.15 M KPP pH 7.2 aufgenommen und Endkonzentrationen von 0.01 % (v/v) 2-ME, 0.1 % (v/v) Triton-X-100 und 1 mM PMSF eingestellt. In einem Waring-Blender-Mixer wurde dann zweimal für 15 Sekunden auf der Stufe "low" und einmal für 15 Sekunden auf der Stufe "high" homogenisiert. Zellen und ebenso

Mitochondrien wurden darauffolgend in 300ml-Portionen mittels eines Ultra-Turrax (18K-Schaft) für 5 Minuten auf höchster Stufe aufgebrochen. Zell- und Membrantrümmer wurden durch Zentrifugation bei 11000 g_{av} für 20 Minuten in einem Beckman-JA-10-Rotor abgetrennt und nochmals in einem Volumen von 1 l wie oben beschrieben extrahiert. Die vereinigten Überstände der 11000 g_{av} -Zentrifugationen wurden mit 500 g (Feuchtgewicht) DE52-Cellulose äquilibriert in 0.15 M KPP pH 7.2 versetzt und 30 Minuten gut gerührt. Die Cellulose wurde dann über eine Nutsche auf Filterpapier abfiltriert, der Durchlauf nach Einstellen des pH auf 6.5 10fach mit deionisiertem Wasser verdünnt und 400 g (Feuchtgewicht) CM52-Cellulose äquilibriert in 15 mM KPP pH 6.5 zugegeben. Der gesamte Ansatz wurde für 2 Stunden kräftig gerührt. Im folgenden wurde das Ionenaustauschermaterial über eine Filternutsche abgesaugt, in eine passende Säule gefüllt und über Nacht mit einer Flußrate von 1 ml/min mit 15 mM KPP pH 6.5 gewaschen. Gebundenes Protein und unter anderem auch Holocytochrom c wurden in einer Stufe mit 0.3 M KPP pH 6.5, 0.5 M NaCl eluiert in einem Gesamtvolumen von nicht mehr als 40-50 ml. Diese Fraktion wurde dann über eine Sephadex-G50-Gelfiltrationssäule geschickt (500ml-Säule, Durchmesser 2.6 cm, äquilibriert in 0.15 M NaCl, Flußrate 40 ml/h), der Durchlauf bei 280 und 405 nm mit einem Durchflußphotometer verfolgt und die Fraktionen, die bei 405 nm eine Absorption zeigten, vereinigt. Da das Holocytochrom c im Fraktionierungsvolumen der Sephadex-G50-Säule läuft, konnten somit gleichzeitig alle größeren Proteine mit dem Ausschlußvolumen dieses Säulenlaufes abgetrennt werden. Im nächsten Schritt wurde der aktive Pool von der Sephadex-G50-Säule 10fach mit Wasser verdünnt, ein pH von 6.5 eingestellt und über eine CM52-Cellulose-Säule (160ml-Säule, Durchmesser 2.6 cm, äquilibriert in 20 mM KPP pH 6.5, Flußrate 40 ml/h) gepumpt, wobei das Holocytochrom c an den Austauscher bindet. Die Säule wurde mit 3 Säulenvolumina Startpuffer gewaschen, stoßweise 5 ml 1%ige 2-ME-Lösung und 5 ml 1 mM Ferricyanid-Lösung übergepumpt und dann ein linearer 400ml-Gradient von 20-300 mM KPP pH 6.5 angelegt. Die Holocytochrom c enthaltenden Fraktionen aus diesem Gradienten wurden vereinigt, gefriergetrocknet und anschließend nach Aufnehmen in 5 ml Wasser gegen 20 mM KPP pH 7 über Nacht in einem Gesamtvolumen von 1000 ml dialysiert. Bis zur vollständigen Reinheit wurde das Holocytochrom c über Amberlite-CG50-II (200-400 mesh) isoliert. Eingesetzt wurde eine 70ml-Säule mit einem Durchmesser von 1.6 cm äquilibriert

in 20 mM KPP pH 7 und einer Flußrate von 20 ml/h. Das Holocytochrom c wurde an das Austauscherharz gebunden, die Säule mit insgesamt zwei Säulenvolumina Startpuffer gewaschen, 2-ME und Ferricyanid wie für die vorherige CM52-Säule beschrieben aufgepumpt, und ein linearer 300ml-Gradient von 50-300 mM KPP pH 7 angelegt. Unter diesen Bedingungen kann die methylierte und unmethylierte Form des Proteins voneinander getrennt werden (Scott und Mitchell, 1969). Die Fraktionen, die das saubere unmethylierte Protein enthielten, wurden gefriergetrocknet, nach Aufnehmen in 5 ml Wasser gegen 150 mM NaCl dialysiert und nach Einstellen von Proteinkonzentrationen von 3-5 mg/ml bei -30°C in Aliquots aufbewahrt. Eine exakte Bestimmung der Menge des isolierten Holocytochrom c erfolgte durch Differenzspektren der reduzierten gegen die oxidierte Form des Proteins ($E_{550\text{ nm} - 533\text{ nm}} = 21.6 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{mmol}$) oder durch Aminosäureanalyse. Ausbeute aus 1000 g Hyphen (Feuchtgewicht): 40-60 mg Holocytochrom c.

2.8.2 Herstellen von Apocytochrom c

Zur Anwendung kam eine nach Ambler und Wynn (1973) modifizierte Methode. Zu 1 ml Holocytochrom-c-Lösung wurden 0.74 g Harnstoff (Endkonzentration 8 M) und 20 mg HgCl_2 gegeben und mit HCl bei Raumtemperatur ein pH von 2 eingestellt. Die Abspaltung der Häm-Gruppe erfolgte dann über Nacht bei Raumtemperatur im Dunklen. Der Ansatz - aber nicht mehr als 5 ml - wurde dann über eine Sephadex-G25-Gelfiltrationssäule (50ml-Säule, Durchmesser 0.9 cm, äquilibriert mit 150 mM NH_4OAc , Flußrate 20 ml/h) geschickt. Fraktionen, die Protein enthielten, wurden vereinigt und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in 2 ml 8 M Harnstoff, 50 mM DTT aufgenommen und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um proteingebundenes Quecksilber zu entfernen. Die Probe wurde sodann über eine wie oben beschriebene G25-Säule diesmal aber äquilibriert mit 250 mM NH_4HCO_3 gegeben. Die Fraktionen, die Protein enthielten, wurden lyophilisiert. Daran anschließend wurde das Apocytochrom c einem Renaturierungszyklus unterworfen: Dazu wird das Lyophilisat in 1-2 ml 8 M Harnstoff, 250 mM NH_4HCO_3 , 50 mM DTT aufgenommen und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz über Nacht gegen 250 mM NH_4HCO_3 , 0.01 % (v/v) 2-ME dialysiert (4°C). In diesem Puffer wurde das Apocytochrom c dann bei -30°C aufbewahrt nach entsprechender Aliquotierung. Die Ausbeute an Apocytochrom c betrug um 80 %. Eine exakte Bestimmung der Proteinmengen

erfolgte über Aminosäureanalyse. Das Protein zeigte keine Absorption bei 410 nm, ein Indiz für die quantitative Abspaltung der Hämgruppe.

2.8.3 Isolierung des 20kD-Proteins

Alle Isolierungsschritte wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei 4°C durchgeführt.

1.Stufe: Präparation von Mitochondrien

1000 g frisch isolierte oder bei -30°C gefrorene Hyphen wurden wie in 2.3.1 beschrieben aufgearbeitet. Dies ergab nach einmaligem Waschen der Mitochondrienrohfraktion und abermaliger Zentrifugation ein mitochondriales Pellet.

2.Stufe: Octylglykosid-Extraktion

Dieses Pellet wurde in 50 ml SMEP resuspendiert, und eine Endkonzentration von 1.8 % (w/v) n-Octylglykosid eingestellt. Die Suspension wurde in einem Dounce-S-Homogenisator mit 10 Streichen behandelt und anschließend für 5 Minuten bei 25°C geschüttelt. Der Extraktionsansatz wurde dann in einem Beckman-Ti70-Rotor für 60 Minuten bei 184000 g_{av} und 4°C zentrifugiert, die klaren Überstände dieser Zentrifugation unter Vermeidung der Abnahme flotierten Lipides gesammelt und über Nacht gegen ein Totalvolumen von 3 l 10 mM Tris-HCl pH 8.5 (eingestellt bei 25°C), 1 mM PMSF dialysiert.

3.Stufe: DE52-Cellulose-Chromatographie

Der dialysierte Octylglykosidextrakt wurde über eine DE52-Cellulose-Säule gepumpt (135ml-Säule, Durchmesser 2.6 cm, äquilibriert mit 10 mM Tris-HCl pH 8.5, Flußrate 50 ml/h) und der Säulenlauf über ein Durchflußphotometer bei 280 nm verfolgt. Die Durchlauffraktion der Säule, die die Apocytochrom-c-bindende Aktivität enthielt, wurde gesammelt.

4.Stufe: Phenyl-Sepharose-Chromatographie

Die aktive Fraktion von der DE52-Säule wurde auf 1 M NaCl und pH 7.2 gebracht und über eine Phenyl-Sepharose-CL4B-Säule gepumpt (80ml-Säule, Durchmesser 1.6 cm, äquilibriert in 1 M NaCl, 10 mM MOPS pH 7.2, Flußrate 30 ml/h). Nach dem Auftragen wurde die Säule über Nacht mit dem genannten Äquilibrierpuffer gewaschen. Die Aktivität wurde dann in einer Stufe mit 50 mM NaCl, 10 mM MOPS pH 7.2, 1.8 % (w/v) Octylglykosid in einer Fraktion von etwa 50 ml eluiert. Das somit gereinigte Protein wurde durch Gefriertrocknen konzentriert, und das Detergenz durch zweimalige Gelfiltration über

Sephadex-G25 oder -G75 abgetrennt.

Ausbeute: ca. 1mg 20kD-Protein.

2.9. Gewinnung spezifischer Antiseren

Das hier beschriebene Verfahren (in Anlehnung an Hennig und Neupert, 1983) ist sowohl zur Gewinnung von Antiseren gegen Holo- und Apocytochrom c als auch gegen das isolierte 20kD-Protein angewandt worden.

Das jeweilige Protein wurde durch Dialyse in Mikrodialysekammern (100-1000 µl) auf 0.1 M KPP pH 7 umgepuffert und auf eine Proteinkonzentration von 0.6 mg pro ml eingestellt. Zu jedem ml wurden 2 µl einer 25%igen Glutardialdehydlösung zur Vernetzung des Proteins hinzugefügt, und es wurde danach für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abfangen überschüssigen Glutardialdehyds wurde anschließend 18 mg/ml festes L-Lysin-HCl zugemischt und eine weitere Stunde inkubiert. Nach erneuter Dialyse gegen 0.1 M KPP pH 7 wurde das quervernetzte Protein in 250µg-Portionen bei -30°C eingefroren und aufbewahrt.

Kaninchen (2.2-2.8 kg) wurden in wöchentlichem Abstand viermal mit jeweils 250 µg Antigen (subkutan in der Rückenregion gespritzt) immunisiert. Die erste Injektion wurde mit einer 1:1-Mischung mit komplettem Freund'schem Adjuvans, alle weiteren mit inkomplettem Freund'schem Adjuvans gemacht. Eine Woche nach der letzten Injektion wurden ca. 60 ml Blut aus der Ohrvene des Tieres abgenommen und wie bei Hennig und Neupert (1983) beschrieben weiterverarbeitet. Das Komplement der gewonnenen Seren wurde durch Inkubation für 45 Minuten bei 56°C inaktiviert, und die Seren aliquotiert bei -30°C aufbewahrt.

2.10 Immunologische Methoden

2.10.1 Ouchterlony-Doppeldiffusion

Zur Kontrolle der Immunantwort und vor allen Dingen Kreuzreaktivität der Seren wurde die Methode der Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony (1953, Acta Pathol. Microbiol. Scand. 32, 231) angewandt: Als Agar-Platten wurden Objektträger für die Mikroskopie eingesetzt. Zum Gießen dreier

Platten wurden 0.15 g Agar purum in 5 ml Veronal-Acetat-Puffer (38.6 mM Diethylbarbiturat, 38.6 mM NaOAc, pH 8.2 mit HCl eingestellt) und 5 ml Wasser in einem Wasserbad gekocht, bis eine klare Lösung sich eingestellt hatte. Der heiße Agar wurde sofort in Portionen von 2.5 ml auf die Objektträger gegeben und fest werden gelassen. Dann wurden mit einer Lochstanze Tröge ausgehoben, die ein Fassungsvermögen von etwa 25 µl hatten. Zumeist wurde der Innentrog mit 1-2 µg Antigen gefüllt und die umliegenden Außentröge mit steigenden Mengen Antiserum. Die Volumina wurden jeweils auf 25 µl mit 150 mM NaCl aufgefüllt. Nach 20-stündiger Inkubation bei 25°C in wassergesättigter Luft wurden die Platten für 6 Stunden in 150 mM NaCl eingelegt, wobei das Medium mehrfach gewechselt wurde. Die Platten wurden dann auf Filterpapier getrocknet, für 10-15 Minuten in 0.25%iger Coomassie-Blue-Lösung in Methanol/Essigsäure/Wasser (5:1:5) gefärbt und schließlich entfärbt in Methanol/Essigsäure/Wasser (5:1:5). Abbildung 1 zeigt die verwendeten Seren gegen das 20kD-Protein, Holo- und Apocytochrom c im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest.

2.10.2 Immunpräzipitation

Immunpräzipitationstechniken wurden angewandt, um qualitativ und auch quantitativ spezifische Proteine nachzuweisen. Die Immunpräzipitation von Holo- und Apocytochrom c wurde nach Hennig und Neupert (1983) mit der direkten bzw. indirekten Methode durchgeführt. Für alle anderen Proteine galt, wenn nicht ausdrücklich anders vermerkt, folgendes Verfahren: Die immunpräzipitierende Fraktion wurde in einem Totalvolumen von 1 ml eingestellt auf 1 % (w/v) Triton-X-100, 0.3 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM PMSF, 15 Minuten bei 4°C in einem Eppendorf-Schüttler inkubiert, 15 Minuten einer Zentrifugation von 27000 g_{av} bei 4°C (JA-20-Rotor) unterzogen, und der dabei anfallende Überstand für die nun folgenden Schritte verwendet. Spezifisches Antiserum wurde an vorgequollene und in oben genanntem Triton-Puffer gewaschene Protein-A-Sepharose-CL4B entsprechend der Titerbestimmung vorangebunden (15 Minuten bei 4°C, 10 mg Trockengewicht Protein-A-Sepharose pro 100 µl Antiserum, in 100-500 µl). Nach Abzentrifugieren der Sepharose für 2 Minuten in einer Eppendorf-Tischzentrifuge und einem einmaligen Waschen in dem genannten Triton-Puffer wurde der Fraktionsüberstand der 27000g_{av}-Zentrifugation zugegeben und die Immunreaktion für 1 Stunde bei 4°C unter ständigem Schütteln in

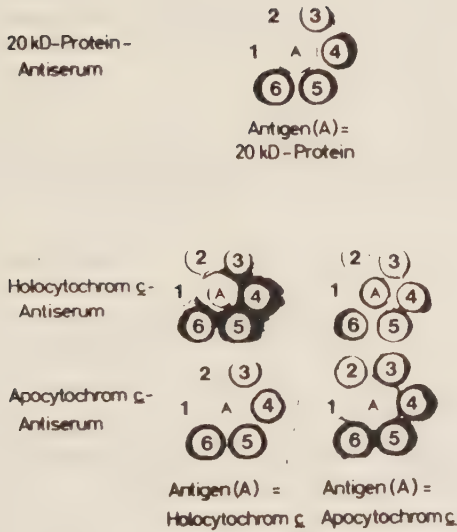


Abb.1: Ouchterlony-Doppeldiffusionstest vom 20kD-Protein-, Holo- und Apocytochrom-c-Antiserum

In den Innentrögen (A) der Agarosegele wurden jeweils 1-2 µg des betreffenden Antigens aufgetragen, in die Außentröge 1-6 je 0, 5, 10, 15, 20 und 25 µl des entsprechenden Antiserums pipettiert. Die Seren gegen Holo- und Apocytochrom c wurden zudem auf ihre Kreuzreaktivität hin geprüft: Beide Antiseren zeigten keine sichtbare Kreuzreaktion.

einem Eppendorf-Schüttler durchgeführt. Im weiteren wurde die Sepharose wie oben beschrieben abzentrifugiert und zweimal mit je 1 ml Triton-Puffer und dreimal mit je 1 ml 10 mM Tris-HCl pH 7.5 gewaschen. Die Immunkomplexpräzipitate wurden, wenn nicht anders angegeben, für die weitere Analyse über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese für 3-5 Minuten bei 95°C in 25-50 µl 2 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) 2-ME, 10 % (v/v) Glycerin und 60 mM Tris-HCl pH 6.8 dissoziiert und die Überstände nach Abzentrifugieren der Sepharose für die Gelelektrophorese eingesetzt.

2.10.3 "Western Blotting"

Die Technik wurde zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von nicht radioaktiv markierten Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen nach der Elektrophorese verwandt.

(i) Elektrophoretischer Transfer von Proteinen aus dem Acrylamidgel auf Nitrocellulose

Proteine aus Polyacrylamidgelen wurden elektrophoretisch nach der von Tobin et al. (1979) publizierten und von Burnette et al. (1981) modifizierten Methode auf Nitrocellulosemembranen (Schleicher und Schüll, BA 83, 0.2 µm) transferiert. Zunächst wurde ein mit Elektrodenpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) feucht gehaltener Sandwich aus einem Scotch-Brite-Polster, mehreren Lagen Filterpapier, dem SDS-Polyacrylamidgel, der Nitrocellulosemembran, wieder mehreren Lagen Filterpapier und zum Schluß ein weiteres Scotch-Brite-Polster hergestellt und zwischen zwei PVC-Platten, die die Elektroden enthielten, gepresst. Die Nitrocellulosemembran zeigte zur Anode, der elektrophoretische Transfer der Proteinbanden des Gels erfolgte bei 6-8 V/cm Elektrodenabstand für 16-22 Stunden in dem oben beschriebenen Elektrodenpuffer. Um das 20kD-Protein effizient zu transferieren mußte in dem Elektrodenpuffer zusätzlich eine Konzentration von 0.02 % (w/v) SDS eingestellt werden. Zur direkten Visualisierung transferierter Proteine wurde die Nitrocellulosemembran für 2 Minuten in gebrauchsfertiger Ponceau-Färbelösung inkubiert, was zudem auch die Lokalisierung der Molekulargewichtstandards aus der Polyacrylamidgelelektrophorese ermöglichte.

(ii) Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose

Die Membran mit den transferierten Proteinen wurde in 0.9 % (w/v) NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4 (im folgenden TBS genannt) und 5 % (w/v) BSA für 30

Minuten unter stetigem Schütteln bei 40°C inkubiert. Dann wurde die Membran überführt in eine frische TBS-BSA-Lösung, die zusätzlich etwa 500 µl des entsprechenden Antiserums/25 ml Medium enthielt, und für 90 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde die Nitrocellulose 10 Minuten in TBS, zweimal 10 Minuten in TBS mit 1 % (v/v) NP40 und abermals 10 Minuten in TBS gewaschen. Zur Sichtbarmachung des gebundenen Antikörpers wurde ^{14}C -Protein-A (siehe auch 2.13) in einem weiteren Schritt an den auf dem transferierten Protein sitzenden Antikörper angebunden. Dazu wurde die Membran wieder in TBS-BSA für 30 Minuten geschüttelt, diesmal aber mit ca. 10^6 dpm ^{14}C -Protein-A/25 ml Medium. Die Nitrocellulose wurde dann nach dem oben beschriebenen Verfahren gewaschen, unter Infrarotlicht getrocknet und autoradiographiert.

2.11 Elektrophoretische Methoden

2.11.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Elektrophese wurde in vertikalen Kammern nach Lämmli (1970) durchgeführt. Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten (130 x 160 mm) in etwa einer Dicke von 0.75-1 mm nach dem unten aufgeführten Schema gegossen, so daß die Endkonzentrationen im Trenngel für Acrylamid und Bisacrylamid 17.5 bzw. 0.2 % (w/v) waren.

Proben für die Elektrophorese wurden zunächst in 2 % (w/v) SDS, 5 % (w/v) 2-ME, 10 % (v/v) Glycerin, 60 mM Tris-HCl pH 6.8 für 3-5 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Gele wurden zumeist über Nacht bei 3 mA gefahren, in 0.1 % (w/v) Coomassie-Blue R250 in Methanol/Essigsäure/Wasser/Glycerin (4:1:5:0.2 = v/v/v/v) gefärbt und anschließend im gleichen Lösungsmittelgemisch entfärbt. Wenn nötig wurden Proben, die in größeren Volumina oder salzhaltigen Puffern gelöst waren, durch TCA ausgefällt (Methode siehe 2.17.1) und zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen.

Lösung	Bodengel	Trenngel	Sammelgel
30 % (w/v) Acrylamid, 0.2 % (w/v) Bisacrylamid	6.7 ml	9.7 ml	0.83 ml
1.875 M Tris-HCl pH 8.8	2 ml	3.5 ml	-
0.6 M Tris-HCl pH 6.8	-	-	0.5 ml
dest. Wasser	1.1 ml	3.5 ml	3.6 ml
10 % (w/v) SDS	0.1 ml	0.167 ml	0.05 ml
TEMED	0.025 ml	0.006 ml	0.005 ml
10 % (w/v) AMPS	0.05 ml	0.084 ml	0.025 ml
Acrylamidanteil	20 %	17.5 %	5 %

Schema 1: Zusammensetzung der Lösungen für die vertikale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

2.11.2 Zweidimensionale Elektrophorese

Zweidimensionale Gelelektrophoresen - eine Kombination von isoelektrischer Fokussierung in der einen und SDS-Polyacrylamidelektrophorese in der zweiten Dimension - wurde nach Ames und Nikaido (1976) mit den Modifizierungen von O'Farrell et al. (1977) durchgeführt.

Zunächst wurde in silikonisierten Glasröhrchen (0.4 x 12.5 cm) in einem pH-Bereich von 7-9 fokussiert. Für 10 ml Gel wurden 5.5 g Harnstoff in 1.33 ml 28.38 % (w/v) Acrylamid und 1.62 % (w/v) Bisacrylamid, 2 ml 10 % (v/v) NP40, 2 ml Wasser und 0.5 ml Ampholine (7-9) gelöst. Nach Entgasen der Lösung wurden 10 µl 10 % (w/v) AMPS und 7 µl TEMED zupipettiert, die Gellösung in die unten mit Parafilm verschlossenen Glasröhrchen gefüllt und mit 20 µl 8 M Harnstoff überschichtet. Nach 1-2 Stunden wurde der Harnstoff durch 20 µl Lyse-Puffer (9.5 M Harnstoff, 2 % (v/v) NP40, 2 % (v/v) Ampholine, 5 % (v/v) 2-ME) ersetzt und mit Wasser überschichtet. Nach weiteren 1-2 Stunden und vollständiger Polymerisierung des Gels wurde mit frischem Lyse-Puffer überschichtet und eine Vorelektrophorese (obere Elektrodenkammer = Anode mit 0.01 M H_3PO_4 , untere Elektrodenkammer = Kathode mit 0.02 M NaOH) für 15 Minuten bei 200 V, 30 Minuten bei 300 V und schließlich für weitere 30 Minuten bei 400 V gefahren. Die Proben konnten sodann in Lyse-Puffer aufgetragen werden und wurden mit 6 M Harnstoff, 0.66 % (v/v) Ampholine überschichtet. Die Fokussierung lief bei 300 V (ca. 4-6 Stunden), bis Holozytochrom c (Pferd) als basisches Protein (pK größer als 9) aus dem Gel gelaufen war. Dann wurde das Gel vorsichtig aus dem Glasröhrchen genommen, zum Entfernen der Ampholine für 2-3 Minuten in SDS-Probenpuffer geschüttelt und dann in ein Sammelgel eines vertikalen 17.5%igen SDS-Polyacrylamidgeles einpolymerisiert. Daraufhin erfolgte die Trennung der fokussierten Proteine nach ihrem jeweiligen Molekulargewicht in der zweiten Dimension.

2.12 Bestimmung von Radioaktivität

2.12.1 Flüssigszintillationsmessung

Zur Quantifizierung von proteingebundener Radioaktivität in Translationsansätzen oder verschiedenen Zellfraktionen bei in-vivo-Markierungen wurde die TCA-Filter-Methode eingesetzt:

Aliquots der zu untersuchenden Probe wurden auf Rundfilter (Whatman Glasfilter GF/A, 25 mm Durchmesser), die vorher mit 10%iger (w/v) TCA in Äther getränkt worden waren, pipettiert und antrocknen gelassen. Diese Filter wurden dann dreimal für 5 Minuten in 5%iger (w/v) TCA gewaschen, im ersten Gang bei Raumtemperatur, dann bei 90°C, dann abermals bei Raumtemperatur, in Äther/Ethanol (1:1) dehydratisiert und getrocknet. Die Filterplättchen wurden in Standard-Szintillationsmessröhrchen (20 ml) mit 0.5 ml 1 % (w/v) SDS, 0.1 M Tris-HCl pH 8 für 2 Stunden unter kräftigen Schütteln inkubiert, um die TCA-gefällten Proteine zu solubilisieren. Dann wurden 12 ml Szintillatorlösung (6 g Permablend III in 600 ml Toluol, 400 ml 2-Methoxyethanol) zugegeben und die Radioaktivität in einem Packard-TriCarb460-Szintillationszähler bestimmt.

Radioaktivität aus wässrigen Proben wurde entweder unter Weglassung der TCA-Filter direkt nach dem gleichen Verfahren bestimmt, oder aber, wenn in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gemessen werden sollte, wurde die Probe in 200 µl der genannten SDS-Lösung aufgenommen und 1.2 ml eines Triton-Szintillators zugefügt (6 g Permablend III in 700 ml Toluol und 300 ml Triton-X-100).

2.12.2 Bestimmung von Radioaktivität in Polyacrylamidgelen und "Western Blots"

Entweder wurden die Gele bzw. Nitrocellulose-Membranen direkt auf Kodak-Röntgenfilmen (X-OMAT AR 5) autoradiographiert, wobei die Gele zuvor unter Vakuum auf Filterpapier getrocknet worden waren, oder nach Vorbehandlung mit Amplify (Amersham) fluorographiert.

2.13 Radioaktive Markierung von Proteinen durch reduktive Methylierung

Das hier beschriebene Verfahren in Abänderung nach Dottavio-Martin und Ravel (1978) wurde zur Herstellung von ^{14}C -Apocytochrom c und ^{14}C -Protein-A eingesetzt.

1 mg Protein umgepuffert durch Dialyse in einem Volumen von 360 µl 150 mM KPP pH 7, 0.01 % (v/v) 2-ME wurde mit 50 µl ^{14}C -Formaldehyd (125 µCi, 60 Ci/mmol, in KPP wie oben) und 90 µl 6 mg/ml NaBH_3CN in KPP versetzt und bei 25°C für 1 Stunde inkubiert. Danach wurde bei 4°C in einer

Mikrodialysekammer (Visking-18/32-Membranen) solange gegen 150 mM KPP pH 7, 0.01 % (v/v) 2-ME dialysiert, bis keine Radioaktivität mehr im Dialysat messbar gewesen war.

Das ^{14}C -Apocytochrom c wurde dann noch wie in 2.8.2 beschrieben einem Renaturierungszyklus unterworfen. Die methylierten Proteine wurden dann aliquotiert und bei -30°C aufbewahrt.

Die durchschnittlich erreichten spezifischen Radioaktivitäten betrugen im Falle des Apocytochrom c 0.6 Ci/mmol, im Falle des Protein-A 0.7 Ci/mmol. Abbildung 2 zeigt den elektrophoretischen Vergleich zwischen dem isolierten Apocytochrom und dem methylierten.

2.14 Bindungstests für ^{14}C -Apocytochrom c

2.14.1 Bindung an isolierte Mitochondrien

Bindungsstudien mit isolierten Mitochondrien wurden grundsätzlich in Gegenwart des Häm-Analogons Deuterohäm durchgeführt, das die Konversion von Apo- zu Holocytochrom c hemmt. Hierdurch wird der Importprozeß auf der Stufe der Bindung blockiert. *Neurospora*-Mitochondrien wurden bei einer Proteinkonzentration von etwa 1 mg/ml in SMEP mit 50 nmol/ml Deuterohäm für 5 Minuten bei 25°C inkubiert, anschließend reisoliert und mit einer Proteinkonzentration von 2-4 mg/ml resuspendiert. Aliquots 100-200 µg Mitochondrien wurden in einem Gesamtvolumen von 300 µl im Bindungspuffer von 250 mM Saccharose, 10 mM MOPS pH 7.2, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.01 % (v/v) 2-ME, 1 % (w/v) BSA, 1 µM Holocytochrom c (von *Neurospora crassa*) in silikonisierten Glasröhrchen mit steigenden Mengen ^{14}C -Apocytochrom c für 20 Minuten bei 25°C inkubiert. Die Mitochondrien wurden dann durch Zentrifugation bei $18000\text{ g}_{\text{av}}$ und 4°C in einem Beckman-JA-20-Rotor pelletiert und ungebundenes Apocytochrom c aus dem Überstand dieser Zentrifugation bestimmt. Die verbliebenen mitochondrialen Pellets wurden in dem Inkubationsmedium gewaschen, dabei transferiert in Eppendorf-Reaktionsgefäße und abermals sedimentiert. Nach Lysieren in 200 µl 1 % (w/v) SDS, 10 mM Tris-HCl pH 8 durch Inkubation für 3-5 Minuten bei 95°C wurde wie in 2.12.2 beschrieben die gebundene Radioaktivität bestimmt.

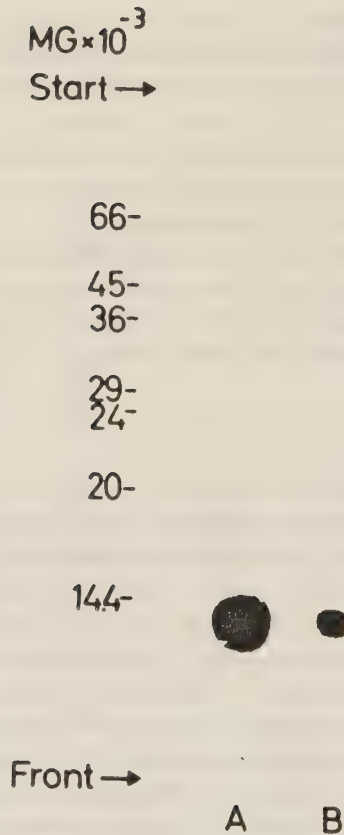


Abb.2: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von isoliertem Apocytochrom c und von durch reduktive Methylierung mit ^{14}C -Formaldehyd radioaktiv markiertem Apocytochrom c

(A) 50 μg isoliertes, chemisch hergestelltes Apocytochrom c nach Proteinfärbung mit Coomassie-Blue R250. (B) 10000 dpm ^{14}C -Apocytochrom c nach Autoradiographie auf Röntgenfilm. Zum Vergleich ist das Laufverhalten eines Molekulargewichtstandards aufgetragen.

Neurospora-Apocytochrom c läuft trotz seines Molekulargewichtes von etwa 12.5kD etwas untypisch knapp unterhalb des Lactalbuminmarkers (14.4kD).

Die Analyse der Bindungskurven erfolgte nach Scatchard (Scatchard, G., 1948/1951, Ann.N.Y.Acad.Sci 51, 660-672). Dabei wurden bei liposomalen und mitochondrialen Bindungskurven biphasische Verläufe erhalten, deren Auswertung (siehe dazu auch Noerby et al., 1980) unter Berücksichtigung der beiden nebeneinander gemessenen unterschiedlichen Bindungsaffinitäten durch mathematisch-graphische Methoden erfolgte. Für die beiden resultierenden Scatchard-Geraden, deren Anstieg der jeweiligen Affinität und deren x-Achsenabschnitt der Zahl der Bindungsstellen proportional ist, muß folgende durch Abbildung 3 dargestellte Gesetzmäßigkeit gelten: Die Strecke von 0 nach P, einem beliebigen Punkt der gemessenen Kurve, muß gleich der Summe der Strecken von 0 zu den jeweiligen Schnittpunkten mit den beiden Scatchard-Geraden sein.

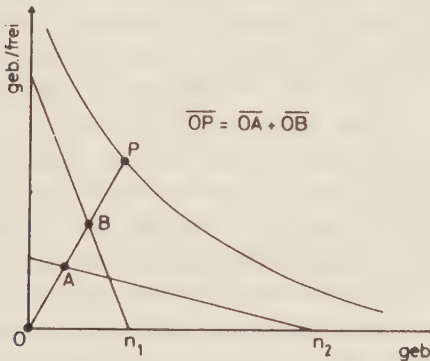


Abb.3: Auswertung biphasischer Bindungskurven (schematisch)

Aufgetragen werden das Verhältnis gebundener Ligand/freier Ligand gegen die Konzentration an gebundenem Liganden. Aus der biphasischen Kurve werden die Scatchard-Geraden, die in n_1 bzw. n_2 die x-Achse schneiden, konstruiert nach der genannten Gesetzmäßigkeit. Somit wird die Meßkurve in eine hoch- und eine niederaffine Bindung aufgelöst.

2.14.2 Bindung an Liposomen ..

2.14.2.1. Präparation von Liposomen und Rekonstitution mitochondrialer Proteine

Liposomen wurden aus einem Volumen von 2.5 ml präpariert. Für einen Ansatz wurden 36 mg Asolectin durch Vortexen in 1.5 ml 10 mM TEA pH 7.2 und in Gegenwart von Glaskügelchen (1 mm Durchmesser) suspendiert und der gesamte Ansatz dann unter Stickstoff für 2 Minuten bei Raumtemperatur in einem Ultraschall-Wasserbad beschallt. Eine micelläre Lösung aus Asolectin, Detergenz und der jeweiligen zu rekonstituierenden Proteinfraction, die grundsätzlich vorher über PD10-Säulen in den verwendeten TEA-Puffer umgepuffert worden war, wurde wie folgt hergestellt: 1 ml der beschallten Asolectin-Suspension wurde gemischt mit 45 mg n-Octylglykosid, 100-750 µg der entsprechenden Proteinfraction, 150 mg Glyzerin, 30 µl 3 M KCl, und das endgültige Volumen von 2.5 ml mit TEA-Puffer eingestellt. Nach 5-minütiger Inkubation des Ansatzes bei Raumtemperatur wurden Vesikel nach der Methode von Brunner et al. (1976) unter Verwendung von Sephadex-G25-PD10-Säulen (1.5 x 5 cm), äquilibriert in TEA-Puffer, hergestellt, ein Verfahren, bei dem das Detergenz über die G25-Säule abgetrennt und die Vesikelbildung eingeleitet wird. Es wurden 1ml-Fractionen des Säulendurchlaufs gesammelt, trübe Fractionen (insgesamt 3 ml) auf eine Endkonzentration von 10 mM CaCl_2 eingestellt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Einstellen einer EDTA-Konzentration von 15 mM wurde dann in den mittlerweile weißen Suspensionen die Bildung großer unilamellarer Vesikel eingeleitet (Papahadjopoulos et al., 1975). Die Liposomen wurden durch Zentrifugation bei 50000 g_{av} und 4°C in einem Beckman-Ti50-Rotor pelletiert und in 1 ml des Liposomen-Bindungspuffers (s.u.) resuspendiert.

2.14.2.2 Bindungstest mit Liposomen

Bindungsanalysen nach Scatchard mit Liposomen wurden in einem Medium, das 10 mM MOPS pH 7.2, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.01 % (v/v) 2-ME, 3 % (w/v) BSA (Sigma) und 1 µM *Neurospora*-Holocytochrom c enthielt, durchgeführt. Dabei wurden Aliquots von 25-75 µl Asolectin-Liposomen in einem Gesamtvolumen von 175 µl mit steigenden Mengen an zugegebenem ^{14}C -Apocytochrom c inkubiert. Ansonsten waren die Bedingungen wie unter 2.14.1 beschrieben. Die Liposomen wurden aber durch Zentrifugation in Cellulosepropionat-

röhrchen in einer Beckman-Airfuge (A 100/30-Rotor) für 5 Minuten bei 20 psi und Raumtemperatur sedimentiert. Ungebundene und gebundene Radioaktivität wurden dann wie oben beschrieben bestimmt.

Anmerkung: Alle Probengefäße, die für Bindungsstudien mit ^{14}C -Apo-cytochrom c verwendet wurden, waren zuvor zur Minderung der unspezifischen Bindung des Proteins an die Gefäßwände mit einer 3%igen (w/v) BSA-Lösung vorinkubiert worden.

2.15 Bindungstest für die Vorstufe des ADP/ATP-Carriers an isolierte Mitochondrien

Die Zahl der hochaffinen mitochondrialen Carrier-Bindungsstellen wurde mit Hilfe des in einem Retikulozytenlysat synthetisierten ^{35}S -markierten Vorstufenproteins bestimmt. Dazu wurde die Carrier-Vorstufe durch folgendes Verfahren angereichert: Zu 1 ml translatiertem Lysat wurden 2 ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung gegeben und bei 0°C für 30 Minuten inkubiert. Das dabei entstandene Präzipitat wurde in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert und zweimal mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen. Nach Wiederaufnahme des Präzipitates in 20 mM MOPS pH 7.2, 3% (w/v) BSA, 70 mM KCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF wurde die Lösung bei 4°C über eine Sephadex-G25-PD10-Säule (äquilibriert in dem genannten Puffer) entsalzt. Bindung an deenergetisierte isolierte Mitochondrien wurde nach Schleyer et al. (1982) mit steigenden Mengen Vorstufenprotein durchgeführt. Gebundene und ungebundene Vorstufe wurden durch Immunpräzipitation mit einem spezifischen Antiserum und anschließender Analyse in der SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese bestimmt. Die Quantifizierung der Radioaktivität in der den ADP/ATP-Carrier repräsentierenden Gelbande erfolgte mit einem Berthold-TLC-Linear-Radioaktivitätsscanner.

2.16 Enzymatische Tests

2.16.1 Adenylatkinase

Adenylatkinaseaktivität wurde nach der bei Schmidt et al. (1984) beschriebenen Methode bestimmt: Zu 1 ml Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 130 mM KCl, 8 mM MgSO_4) wurden bei Raumtemperatur pipettiert

- 20 μl 30 mM NADH
- 5 μl 100 mM ATP
- 10 μl 50 mM Phosphoenolpyruvat
- 5 μl 1 mM Rotenon
- 5 μl 1.5 mM Oligomycin
- 10 μl Pyruvatkinase/Lactatdehydrogenase (jeweils 20 U/ml)
- 15-50 μl Probe (kurz zuvor auf 2.5 % (w/v) Genapol-X-100 eingestellt).

Dann wurde die Reaktion nach Registrieren der Hintergrundaktivität durch Zugabe von 5 μl 150 mM AMP gestartet und die Absorptionsabnahme bei 366 nm verfolgt.

2.16.2 Fumarase

Diese Enzymaktivität wurde nach Kanarek und Hill (1964) gemessen. Zu 500 μl Puffer (25 mM KPP pH 7) wurden 500 μl Wasser, 5-50 μl Probe - wie unter 2.16.1 mit Genapol solubilisiert - zugemischt und die Reaktion mit 50 μl 50 mM Malat gestartet. Verfolgt wurde der Extinktionsanstieg bei 240 nm. Der Test wurde ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.16.3 Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Das Enzym wurde in seiner Aktivität nach Bergmeyer et al. (1970) bestimmt. Zu 2590 μl Puffer (0.1 M TEA) wurden 200 μl 0.1 M MgCl_2 , 100 μl 35 mM Glucose-6-phosphat und 100 μl 11 mM NADP pipettiert. Der Start der Reaktion erfolgte durch Probenzugabe (2.5-5 μl). Die Abnahme der Absorption bei 340 nm wurde verfolgt.

2.17 Analytische Methoden

2.17.1 Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951)

Die zu bestimmende Probe wurde mit dest. Wasser auf ein Volumen von 1 ml gebracht.

100 µl 0.15%ige (w/v) Desoxycholat-Lösung wurden zugemischt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Dann wurde das in der Probe enthaltene Protein durch Zugabe von 200 µl 72%iger (w/v) TCA bei 4°C für 45 Minuten gefällt und bei 5000 g_{av} für 10 Minuten abzentrifugiert (JA-20-Rotor). Das resultierende Pellet wurde in 500 µl 1N NaOH gelöst, 2 ml Reagenz A (100 ml 4%ige (w/v) Na₂CO₃-Lösung wurden mit 1 ml 4 % (w/v) Na-K-Tartrat und 1 ml 2 % (w/v) CuSO₄ × 5 H₂O kurz vor Verwendung gemischt) zupipettiert und der Ansatz dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden, um auch in Gegenwart von Detergentien und Lipid die Proteinbestimmung durchführen zu können, wie bei Cachman et al. (1979) beschrieben 500 µl einer 25%igen (w/v) SDS-Lösung zugegeben. 100 µl Folin-Ciocalteus Phenolreagenz wurden zupipettiert bei gleichzeitiger Durchmischung und weitere 30 Minuten inkubiert. Dann wurden die Extinktionen bei 700 nm gegen Luft gemessen. Als Proteinstandard diente Gammaglobulin vom Rind.

2.17.2 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Diese Art der Proteinbestimmung wurde dann durchgeführt, wenn es darum ging, schnell die Proteinkonzentrationen zu ermitteln. Verwendet wurde das Protein-Reagenz und die Vorschrift für die Makrobestimmung der Firma BioRad. Als Proteinstandard diente wiederum Gammaglobulin von Rind.

2.18 Chemikalien und Geräte

2.18.1 Chemikalien

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- ¹⁴C-Formaldehyd (60 Ci/mmol) von NEN Corp., Boston, Mass. USA
- ³H-Leucin (45-70 Ci/mmol), ³⁵S-Methionin (ca. 800 Ci/mmol) und ³⁵S-Sulfat (25-40 Ci/mg) von Amersham-Buchler, Braunschweig

- Quarzsand und TCA von Riedel-de-Haen, Hannover-Seelze
- Nonidet NP40 von Roth, Karlsruhe
- AMP, ATP, GTP, Kreatinkinase, NADH, NADP, Malat, Nuclease, n-Octylglykosid, Oligomycin, Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase/LDH von Boehringer, Mannheim
- Genapol-X100 von Hoechst, Frankfurt
- Asolectin, BSA, CCCP, Häm-in, Heparin, Kreatinphosphat, Markerproteine für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und isoelektrische Fokussierung, MOPS, TLCK, Trypsin, Trypsininhibitor und poly(U)-Cellulose von Sigma, München
- Acrylamid, Amberlite-CGII, p-Aminosalicylat, Bisacrylamid, Coomassie-Blue R250, Ethanol, Harnstoff, Natriumcyanoborhydrid, Nembutal, Ponceau-S, Rotenon, SDS, Servalyt-Ampholine, Silikonlösung und TEMED von Serva, Heidelberg
- Deuterohäm von Porphyrin Products, Logan, Utah USA
- Proteinreagenz und Proteinstandard für die Bradford-Proteinbestimmung von BioRad, München
- CM52- und DE52-Cellulose von Whatman, Maidstone, Kent England
- Dialyseschläuche Visking 18/32 von Medicell, London England
- Percoll, Protein-A-Sepharose-CL4B, Phenyl-Sepharose, Sephadex-G25, -G50 und -G75 von Pharmacia, Freiburg
- Glasperlen von Braun, Melsungen
- Nitrocellulosemembranen von Schleicher und Schüll, Dassel
- Freund's Adjuvans von Behring-Werke, Marburg
- Permablend III von Packard Instr. Comp., Downes Grove, Illinois USA
- alle anderen Chemikalien von Merck, Darmstadt.

2.18.2 Geräte

- Chromatographiesäulen, Durchflußmonitore, Peristaltikpumpen, Fraktionssammler, Gradientenmischer und Spannungsgeräte für die Elektrophorese von Pharmacia, Freiburg
- Airfuge, Kühlzentrifugen J2-2i und Ultrazentrifugen der L8-Serie von Beckman Instr., München
- Flüssigszintillationszähler TriCarb460 von Packard Instr. Comp., Downes Grove, Illinois USA

- TLC-Radioaktivitätsscanner von Berthold, Wildbad
- Thermostaten, Schüttler, Tischzentrifugen und Densitometer von Eppendorf, Hamburg
- Ultraschallwasserbad Bransonic B32 und Cell Disruptor B15 von Branson, Heusenstamm
- Waring Blender und Vortex-Mixer von Bender und Hobein, Zürich/München
- Ultra-Turrax und Magnetprüher von Ika, Staufen
- Lyophilisator von Heraeus-Christ, Osterode/H.
- Pipetten Gilson von Abimed, Düsseldorf
- Photometer UV-120-02 und UV-240 von Shimadzu, Kyoto Japan.

3. ERGEBNISSE

3.1 Bindung von ^{14}C -Apocytochrom c an isolierte Mitochondrien

3.1.1 Scatchard-Analyse der Bindung

Chemisch hergestelltes und reduktiv methyliertes Apocytochrom c (siehe 2.8.2 und 2.13) wurde als Ligand zur Bestimmung der Parameter der Apocytochrom-c-Bindung an Mitochondrien eingesetzt. Diese Versuchskonzeption hatte im Vergleich zu den Bindungs- und Importstudien aus Gesamttranslationsansätzen (Zimmermann et al., 1979a u. b; Hennig und Neupert, 1981) mehrere Vorteile: Zum ersten konnte die spezifische Radioaktivität des ^{14}C -methylierten Apocytochrom c exakt bestimmt werden. Sie betrug durchschnittlich für verschiedene Präparationen 0.6 Ci pro mmol Protein. Zum zweiten konnten optimale, chemisch kontrollierte Bedingungen für die Bindung gewählt werden, weil definierte Puffersysteme eingesetzt werden konnten.

Die Bindung von ^{14}C -Apocytochrom c an isolierte und mit Deuterohäm vorbehandelte Mitochondrien wurde wie in 2.14.1 beschrieben durchgeführt, indem konstante Mengen Mitochondrien mit steigenden Mengen zugegebenes ^{14}C -Apocytochrom c inkubiert, und anschließend die gebundene und freie Radioaktivität bestimmt wurden. Abbildung 4 zeigt die Scatchard-Analyse dieser Bindung. Die biphasische Titrationskurve wurde wie 2.14 beschrieben in eine hoch- und eine niederaffine Bindung aufgelöst. Die hochaffinen Bindungsstellen an Mitochondrien zeigten eine Assoziationskonstante von $2.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, ihre Anzahl betrug 90 pmol/mg mitochondriales Protein. Die niederaffine Bindung hatte eine Assoziationskonstante von $4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ bei 230 pmol/mg mitochondriales Protein Bindungsstellen.

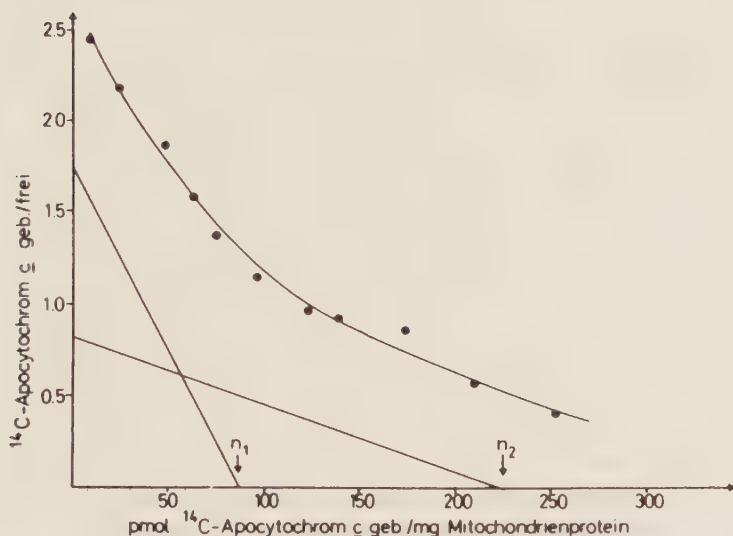


Abb.4: Titration von Apocytochrom-c-Bindungsstellen an isolierten Neurospora-Mitochondrien (Scatchard-Plot)

Mitochondrien wurden wie in 2.3.3 beschrieben isoliert, zunächst mit 50 nmol/ml Deuterohäm für 5 Minuten bei 25°C vorbehandelt und reisoliert. Jeweils 170 µg Mitochondrienprotein wurden dann für 25 Minuten bei 25°C mit steigenden Mengen ^{14}C -Apocytochrom c inkubiert, und die Verteilung von gebundenem und freiem Apocytochrom c bestimmt (siehe 2.14.1). Die in n_1 bzw. n_2 schneidenden Scatchard-Geraden wurden durch mathematisch-graphische Methoden erhalten und spiegeln die Zahl der jeweiligen Bindungsstellen wieder. Die Assoziationskonstanten K_a wurden aus der Konzentration mitochondrialen Proteins (bestimmt nach 2.17.2) kalkuliert. Die spezifische Radioaktivität des ^{14}C -Apocytochrom c wurde durch Flüssigszintillationsmessung und Aminosäureanalyse ermittelt.

3.1.2 Proteasesensitivität der hochaffinen Bindung

Eine Eigenschaft einer rezeptorvermittelten hochaffinen spezifischen Bindung sollte ihre Proteasesensitivität sein. Für die untersuchte hochaffine Apocytochrom-c-Bindung an Mitochondrien muß zudem neben dieser spezifischen Bindung auch der folgende Schritt des Imports - die Reifung zum Holocytochrom c - proteasesensitiv sein, wenn dieser zweite Schritt die spezifische Erkennung durch einen Rezeptor voraussetzt.

So wurde zunächst unter Verwendung der im zellfreien Proteinsynthesystem von *Neurospora crassa* synthetisierten Vorstufe die Proteasesensitivität der Bindung von Apocytochrom c und dessen Konversion zu Holocytochrom c untersucht (Abbildung 5). Dazu wurden isolierte Mitochondrien mit steigenden Mengen Trypsin vorbehandelt und dann mit oder ohne Deuterohäm mit dem ^3H -markierten Apocytochrom c aus dem zellfreien Translationssystem inkubiert. Im Falle des zugegebenen Deuterohäms ist nur die Bindung von Apocytochrom c an Mitochondrien zu beobachten, da die Häm-Lyase gehemmt ist, während ohne Zugabe von Deuterohäm die Vorstufe bis zum Holocytochrom c konvertiert wird (Hennig und Neupert, 1981). Gebundenes Apocytochrom c bzw. konvertiertes Holocytochrom c wurden dann durch Immunpräzipitation mit Hilfe spezifischer Antiseren bestimmt (siehe dazu auch 2.10.1). Aus Abbildung 5 ist ersichtlich, daß mit steigenden Trypsinmengen, mit denen Mitochondrien vorbehandelt wurden, in gleicher Weise Apocytochrom-c-Bindung an Mitochondrien als auch die anschließende Konversion zu Holocytochrom c inhibiert wurden. Bei Vorbehandlung der Mitochondrien mit 40 µg Trypsin/mg Protein und ml war die Bindung und Konversion fast vollständig gehemmt. Eine Vorbehandlung der isolierten Mitochondrien mit 40 µg Trypsin pro mg Protein und ml wurde daraufhin auch für die Titration der ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung vorgenommen, um über die Scatchard-Analyse eine Aussage bezüglich der Proteasesensitivität der hochaffinen Bindung zu erhalten.

Dazu wurden Mitochondrien vortrypsiniert mit oder ohne Trypsininhibitor im Ansatz, und dann wie üblich die ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung gemessen. Abbildung 6 zeigt diese Bindungskurven für die untrypsinierten und trypsinierten Mitochondrien. Durch die Proteasevorbehandlung wurde eindeutig die hochaffine Bindung reduziert, was sich in dem Abflachen des vorderen ersten Teils der Bindungskurve manifestiert. Die niederaffine Bindung schien nur unwesentlich durch die Protease beeinflußt worden zu sein.

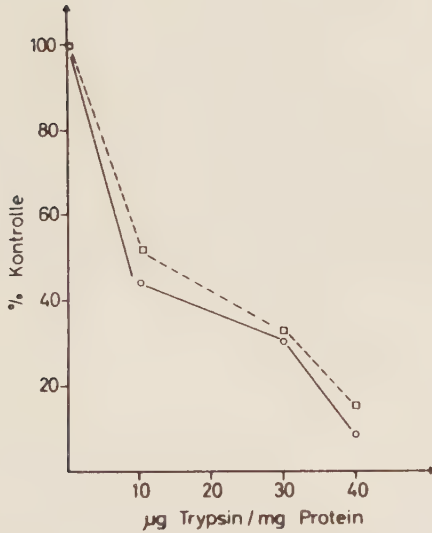


Abb.5: Inhibition der Bindung von Apocytochrom c und dessen Konversion zu Holocytochrom c durch Trypsinvorbehandlung der Mitochondrien
Eine Mitochondriensuspension in SME-Puffer wurde in 4 Portionen aufgeteilt, wobei jede 1 mg Protein in 1 ml enthält. Diese wurden dann mit 0, 10, 30 oder 40 µg Trypsin für 25 Minuten bei 25°C behandelt, sodann ein 10facher Überschuß bezogen aufs Trypsin an Sojabohnen-Trypsininhibitor zugegeben und für weitere 5 Minuten inkubiert bei 25°C. Die Mitochon-

drien wurden reisoliert, einmal in SMEP-Puffer gewaschen und danach jeweils in 100 µl SMEP-Medium resuspendiert. Jeder Ansatz wurde dann halbiert und zu der einen Hälfte 50 nmol Deuterohäm zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei 25°C wurden dann jeweils 1 ml einer postribosomalen Fraktion, die nach zellfreier Proteinsynthese mit ^3H -Leucin erhalten worden war (siehe 2.5), zupipettiert und weitere 20 Minuten bei gleicher Temperatur inkubiert. Danach wurden die Mitochondrien abzentrifugiert und einmal in SMEP-Puffer gewaschen. Dann wurde aus diesen Mitochondrien wie bei Hennig und Neupert (1983) beschrieben aus den Ansätzen, die Deuterohäm enthielten, Apocytochrom c und aus den Ansätzen ohne Deuterohäm Holocytochrom c unter Verwendung der entsprechenden spezifischen Antiseren immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unterworfen und die Radioaktivität in der Apocytochrom-c- bzw. Holocytochrom-c-Bande nach Schneiden der Gelstreifen in 1mm-Fractionen bestimmt. In der 0 µg-Trypsin-Kontrolle, die hier in der Abbildung 100 % gesetzt wurde, wurden 4400 dpm Apocytochrom c bzw. 10000 dpm Holocytochrom c gefunden.

0 — 0 : Bindung von Apocytochrom c

□ - - □ : Konversion zu Holocytochrom c

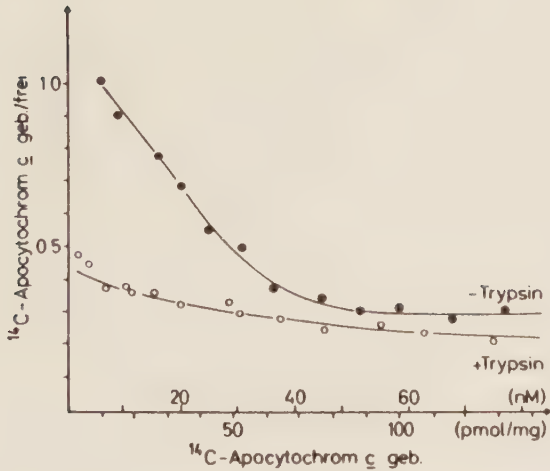


Abb.6: Trypsinsensitivität der ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung an Mitochondrien (Scatchard-Plot)

Mitochondrien wurden in SME-Puffer wie in 2.3.2 beschrieben isoliert und bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml mit 40 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin bei 25°C für 25 Minuten behandelt. 400 μg Sojabohnen-Trypsininhibitor/40 μg Trypsin wurden entweder vor Trypsingabe oder nach Inkubation mit Trypsin zugesetzt und weiter für 5 Minuten bei 25°C inkubiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert und einmal in SMEP-Puffer gewaschen. Dann wurden gleiche Mengen proteasebehandelter (+Trypsin) und unbehandelter (-Trypsin) Mitochondrien dem ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindungstest unterzogen (siehe 2.14.1). Für die hochaffine Bindung in der Kontrolle (-Trypsin) ergab sich eine Assoziationskonstante von $2.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ und eine Zahl von 60 pmol/mg Mitochondrienprotein Bindungsstellen.

3.1.3 Spezifität der hochaffinen ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung

Es konnte für das im zellfreien homologen System von *Neurospora crassa* synthetisierte und in Gegenwart von Deuterohäm an Mitochondrien gebundene ^3H -Apocytochrom c durch Verdrängung mit unmarkierten, chemisch präparierten Apocytochrom c gezeigt werden, daß kein Unterschied zwischen der nativen und chemisch hergestellten Vorstufe besteht (Hennig et al., 1983). Das ^{14}C -Apocytochrom c wurde in gleicher Weise auch daraufhin untersucht (Abbildung 7). Dazu wurde an Mitochondrien in Gegenwart von Deuterohäm ^{14}C -Apocytochrom c vorangebunden, wobei Ligandenkonzentrationen gewählt wurden, die hauptsächlich die hochaffinen Bindungsstellen besetzen sollten. Gleiche Mengen Mitochondrien, welche ^{14}C -Apocytochrom c gebunden hatten, wurden mit steigenden Mengen an unmarkiertem, chemisch präpariertem Apocytochrom c inkubiert und die Menge des danach noch an Mitochondrien gebundenen Liganden ^{14}C -Apocytochrom bestimmt. Dies geschah in Gegenwart eines Überschusses an *Neurospora*-Holocytochrom c, um spezifisch die Kompetition des Apocytochrom c zu erfassen. 50 % Verdrängung wurden bei einer Konzentration von 190 pmol/ml unmarkierten Apocytochrom c beobachtet, was den 200-240 pmol/ml bei der Verdrängung der ^3H -markierten nativen Vorstufe entspricht (siehe Hennig et al., 1983). Das verwendete ^{14}C -methylierte Apocytochrom c verhält sich demnach also gleich wie das native Vorstufenprotein.

Ein weiteres Kriterium, um die Spezifität der hochaffinen Bindung von ^{14}C -Apocytochrom c an Mitochondrien nachzuweisen, war die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Bindungskurve im Scatchard-Plot: Die beispielsweise dreifache Menge Mitochondrien im beschriebenen Bindungstest mit steigenden ^{14}C -Apocytochrom-c-Konzentrationen sollte dann auch das dreifache Signal, d.h. die dreifache Anzahl hochaffiner Bindungsstellen, ergeben. Abbildung 8 zeigt ein derartiges Experiment, in welchem mit 15 µg Mitochondrien im Testansatz 1.5 pmol hochaffine Bindungsstellen ($4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), mit 45 µg Mitochondrien aber 4 pmol unter ansonsten identischen Bedingungen titriert wurden. Dies liegt größenordnungsmäßig im Bereich des erwarteten 3fachen Signals.

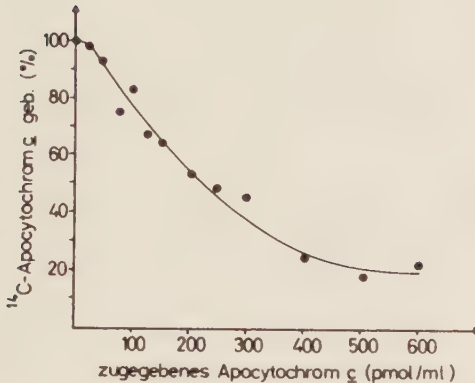


Abb.7: Kompetitive Verdrängung von an Mitochondrien gebundenem ^{14}C -Apocytochrom c durch unmarkiertes chemisch präpariertes Apocytochrom c

1 mg isolierte Mitochondrien (siehe 2.3.2) wurden in einem Gesamtvolumen von 1 ml mit 50 nmol Deuterohäem für 5 Minuten bei 25°C in dem üblichen Bindungspuffer (siehe 2.14.1) inkubiert und dann mit insgesamt 30 pmol ^{14}C -Apocytochrom c versetzt. Nach 25 Minuten bei 25°C wurden die Mitochondrien reisoliert, einmal gewaschen und in Bindungspuffer einschließlich 1 μM *Neurospora*-Holocytochrom c resuspendiert. Die Mitochondrien wurden anschließend 25 μg -weise in einem Gesamtvolumen von 200 μl in Bindungspuffer einschließlich 1 μM Holocytochrom c mit steigenden Mengen ^{14}C -Apocytochrom c inkubiert (0-600 pmol/ml). Nach 25 Minuten bei 25°C wurden die Mitochondrien abzentrifugiert, und die Menge an restlich gebundenen ^{14}C -Apocytochrom c bestimmt. Die Menge gebundenen ^{14}C -Apocytochrom c in der Probe, die kein zugegebenes unmarkiertes Apocytochrom c enthielt, wurde 100 % gesetzt.

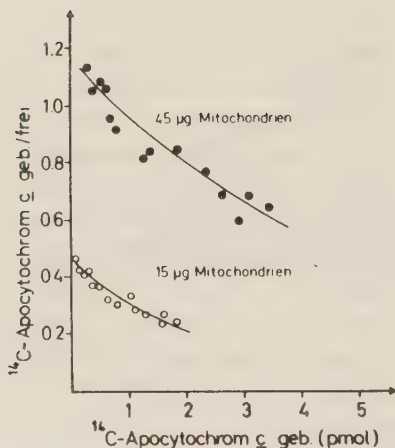


Abb.8: Abhängigkeit der Zahl der hochaffinen ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindungsstellen von der Mitochondrienkonzentration

Deuterohäm-behandelte Mitochondrien, isoliert in SMEP-Puffer (2.3.2), wurden 15µg- bzw. 45µg-weise in einem Gesamtvolumen von 200 µl unter den in 2.14.1 genannten Bedingungen mit steigenden Mengen ^{14}C -Apocytochrom c für 25 Minuten bei 25°C inkubiert. Nach Bestimmen der ungebundenen und gebundenen Radioaktivität wurden die Scatchard-Plots für die beiden Mitochondrienkonzentrationen aufgenommen.

3.1.4 Einflüsse auf die hochaffine spezifische ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung an isolierte Mitochondrien

Zunächst wurden Einfluß von pH und Ionenstärke auf die Bindung an isolierte Mitochondrien untersucht. Optimale Bedingungen für die Bindung wurden bei einem pH von 7.2 beobachtet (Abbildung 9A). Die Bindung von ^{14}C -Apocytochrom c war zudem abhängig von der Konzentration an Kochsalz im verwendeten Bindungspuffer. Sie sank kontinuierlich mit steigender Salzkonzentration (Abbildung 9B).

Außerdem konnte gezeigt werden, daß divalente Kationen wie Mg^{2+} oder Ca^{2+} nicht mit der ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung interferieren (Konzentrationen bis hin zu 10 mM Mg^{2+} bzw. 2 mM Ca^{2+}). Polylysin (Kettenlänge etwa 60 Lysinreste) beeinflusste ebenso die Bindung nicht, wenn bis zu einer Konzentration von 1 mmol/ml eingesetzt.

Für das verwendete ^{14}C -Apocytochrom c wurden folgende Bedingungen und Voraussetzungen gefunden, die einen entscheidenden Einfluß auf die hochaffine Bindungseigenschaft hatten:

1. ^{14}C -Apocytochrom c, das nach Methylierung und Renaturierung (siehe 2.13) bei -30°C eingefroren wurde, erwies sich als vollständig inaktiv bezüglich der hochaffinen Bindung, wenn es nach Auftauen und abermaligem Einfrieren eingesetzt wurde. Dies wies darauf hin, daß die Konformation des Apo-Proteins offensichtlich definiert sein muß und relativ instabil ist. ^{14}C -Apocytochrom c wurde deshalb immer nur unmittelbar vor seinem Einsatz langsam aufgetaut. Durch mehrmaliges Einfrieren denaturiertes ^{14}C -Apocytochrom c konnte durch einen abermaligen Renaturierungszyklus mit Harnstoff und DTT reaktiviert werden.
2. Die Anzahl der bei der reduktiven Methylierung in das Protein eingeführten Methylgruppen war ebenfalls entscheidend für die Bindungsaktivität des Apocytochrom c: Bei mehr als 5 Methylgruppen pro Molekül Apocytochrom c war das resultierende Protein inkompetent für eine hochaffine Bindung an Mitochondrien.

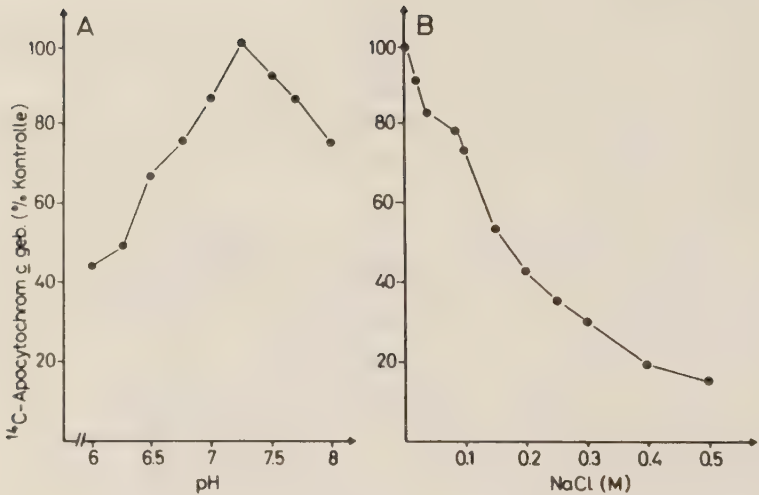


Abb.9: pH- und Salzabhängigkeit der ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung

Nach der Percoll-Methode (2.3.3) isolierte Mitochondrien wurden zunächst für 5 Minuten vorinkubiert bei 25°C mit 50 nmol/ml Deuterohäm in SMEP-Puffer und reisoliert. Dann wurden 6 pmol ^{14}C -Apocytochrom c zu 250 μl -Ansätzen von SMEP-Puffer, die auf die entsprechenden pH-Werte oder NaCl-Konzentrationen eingestellt waren, hinzugegeben. Mitochondrien (0.2 mg Protein) wurden in jeden Ansatz resuspendiert und 25 Minuten bei 25°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Mitochondrien in einer Beckman-Airfuge (Cellulosepropionatröhrchen) für 5 Minuten bei 100000 g_{av} und einmaligem Waschen wurde die mit den Mitochondrienpellets assoziierte Radioaktivität bestimmt. Für die pH-Abhängigkeit (A) wurde die gemessene höchste gebundene Radioaktivität (pH 7.25) gleich 100 % gesetzt, für die Salzabhängigkeit (B) die gebundene Radioaktivität des Ansatzes, der kein zusätzliches NaCl enthielt.

3.2 Messung der hochaffinen spezifischen Apocytochrom-c-Bindung im mitochondrienfreien System

3.2.1 Rekonstitution der hochaffinen Bindung in Asolectin-Liposomen

Da mit Hilfe des ^{14}C -Apocytochrom c Mitochondrienbindungsstellen nachgewiesen und gemessen worden sind, die alle Eigenschaften von Importrezeptoren aufwiesen, sollte diese Art von Meßsystem auch angewendet werden, um die Isolierung des geforderten Rezeptorproteins zu verfolgen. Dazu mußte ein Bindungstest in einem mitochondrienfreien System entwickelt werden, der alle Eigenschaften des Bindungstests an Mitochondrien aufweisen sollte. Die Methode der Wahl war die Rekonstitution der Bindungsstellen in artefizielle Liposomen (siehe 2.14.2).

Isolierte *Neurospora*-Mitochondrien wurden dazu zunächst mit dem nicht-ionischen Detergenz n-Octylglykosid extrahiert (1.8 % w/v) und die dabei erhaltenen Extrakte dann in Asolectin-Liposomen inkorporiert. Der Detergenz-Extrakt wurde mit dem Lipid und in 1.8 % Octylglykosid (Endkonzentration) gemischt, und das Detergenz dann durch Gelfiltration an Sephadex-G25 entfernt, was die Bildung vesikulärer Membranen einleitet. Diese Membranen wurden dann über die im Asolectin enthaltenen negativ geladenen Phosphatidylserine mit Ca^{2+} fusioniert. Nach Entfernen des Ca^{2+} durch EDTA bilden sich dann unilamellare Vesikel (Papahadjopoulos et al., 1975), die dann - wenn auch bei etwas höheren g-Zahlen - wie Mitochondrien zentrifugierbar sind. Diese so gewonnenen Liposomen wurden dann auf ihre Fähigkeit hin untersucht, ^{14}C -Apocytochrom c spezifisch, hochaffin und proteasesensitiv zu binden.

Abbildung 10 zeigt das Bindungsverhalten an Liposomen, in die entweder Extrakte aus trypsinbehandelten oder unbehandelten Mitochondrien rekonstituiert worden waren: Die hochaffine, trypsinsensitive mitochondriale Bindung von ^{14}C -Apocytochrom c fand sich in den Extrakt-Liposomen wieder.

Die gemessene Assoziationskonstante lag mit $2.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ sehr nahe der bei Mitochondrien gemessenen Affinität. Die etwa 18 % des in Liposomen rekonstituierten mitochondrialen Proteins zeigten rund 300 pmol/mg hochaffine Bindungsstellen.

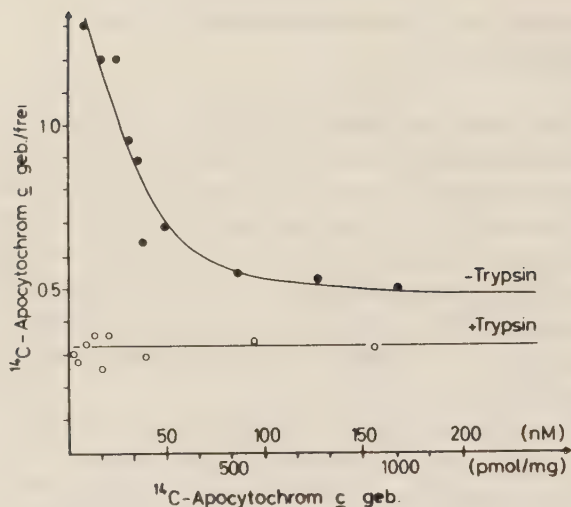


Abb.10: Rekonstitution der hochaffinen trypsinsensitiven

^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung in Liposomen

Mitochondrien wurden wie in der Beschreibung zur Abbildung 6 mit Trypsin (+Trypsin) oder mit Trypsin in Gegenwart von Trypsininhibitor (-Trypsin) behandelt. Nach Reisolieren und Waschen der Mitochondrien wurden sie dann bei Proteinkonzentrationen von 5 mg/ml in SMEP-Puffer mit 1.8 % (w/v) Octylglykosid resuspendiert und für 5 Minuten bei 25°C durch stetiges Schütteln extrahiert. Nach Zentrifugation bei 10000 g_{av} für 60 Minuten bei 4°C wurden somit als Überstände mitochondriale Extrakte gewonnen. Wie in 2.14.2.1 beschrieben wurden 600 µg mitochondriale Extrakte in Liposomen rekonstituiert und letztendlich in 1 ml Bindungspuffer resuspendiert und in 50 µl-Aliquots im Liposomenbindungstest eingesetzt. Die Extrakte wurden präpariert von Mitochondrien mit etwa 75 pmol/mg hochaffinen Bindungsstellen und enthielten 30 % des mitochondrialen Proteins. Nach der Rekonstitution enthielten die Liposomen noch 18 % des Mitochondrienproteins mit etwa 300 pmol/mg hochaffinen ($K_a = 2.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) trypsin-sensitiven Bindungsstellen.

3.2.2 Spezifität der liposomalen ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung

Zunächst wurde die kompetitive Verdrängung von ^{14}C -Apocytochrom c durch unmarkiertes, chemisch präpariertes Apocytochrom c an Liposomen, in die mitochondrialer Extrakt rekonstituiert worden war, untersucht. Abbildung 11 zeigt, daß nur Apocytochrom c, nicht aber Holocytochrom c in der Lage ist, das gebundene ^{14}C -Apocytochrom c zu verdrängen. 50 % Verdrängung der markierten Vorstufe wurden dabei bei etwa 230 pmol/mg unmarkiertem Apocytochrom c beobachtet, was damit größenordnungsmäßig wieder gut in den bei Mitochondrien beobachteten Bereich paßt.

Weiterhin wurde auch wie im Fall der Mitochondrienbindung untersucht, ob das gemessene Signal der ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung an Liposomen abhängig ist von der eingesetzten Konzentration der in Liposomen rekonstituierten mitochondrialen Extrakte. Das Ergebnis zeigte (siehe dazu Abbildung 12) für die dreifache Menge eingesetzter Extrakt-Liposomen die etwa 2.7fache Anzahl hochaffiner ($K_a = 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) Bindungsstellen bei ansonsten identischen Testbedingungen.

Diese Konzentrationsabhängigkeit konnte auch für Liposomen gezeigt werden, in die bei gleicher Lipidmenge steigende Konzentrationen mitochondrialer Extrakte rekonstituiert worden waren.

3.3 Isolierung der Apocytochrom-c-Bindungsaktivität aus *Neurospora*-Mitochondrien

Die bislang dargestellten Ergebnisse wiesen die Möglichkeit auf, die mitochondriale ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindungsstellen in artefizielle Liposomenmembranen zu rekonstituieren und damit einen Test in der Hand zu haben, mit dem die Isolierung des geforderten Proteins möglich sein mußte. Mit Hilfe dieses Testsystems wurde ein Protein aus *Neurospora crassa*-Mitochondrien charakterisiert, dessen Isolierung und Reinigung sich wie folgt gestaltete (für detailliertere Angaben siehe 2.8.3):

Zunächst wurde die Apocytochrom-c-bindende Aktivität aus isolierten Mitochondrien mit Hilfe des nichtionischen Detergenz n-Octylglykosid extrahiert. Eine abermalige Detergenzextraktion des nach Zentrifugation des ersten Extraktionsansatzes anfallenden Membranpellets ergab keine

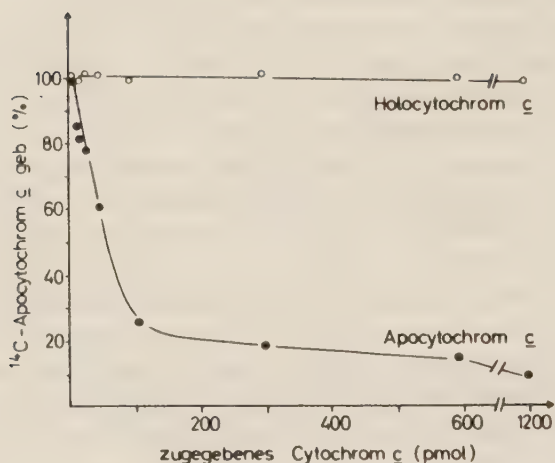


Abb.11: Kompetitive Verdrängung von ^{14}C -Apocytochrom c gebunden

an Liposomen mit rekonstituierten mitochondrialen Extrakten

Mitochondriale Apocytochrom-Bindungsstellen wurden wie in Abbildung 10 beschrieben mit Detergenz extrahiert und in Asolectin-Liposomen rekonstituiert. Pro mg rekonstituiertes mitochondriales Protein wurden dann in dem liposomalen Bindungspuffer (siehe 2.14.2.2) 100 pmol ^{14}C -Apocytochrom c angebunden, die Liposomen reisoliert und einmal mit Bindungspuffer gewaschen. Aliquots wurden sodann im liposomalen Bindungspuffer (ohne Holo- cytochrom c) für 25 Minuten bei 25°C mit steigenden Mengen entweder unmarkiertem Apocytochrom c oder aber Holo- cytochrom c inkubiert. Nach abermaliger Sedimentierung der Liposomen wurde das noch verbliebene restlich gebundene ^{14}C -Apocytochrom c bestimmt. Die ohne Zusatz von unmarkiertem Apo- bzw. Holo- cytochrom c ermittelte gebundene Menge ^{14}C -Apocytochrom c wurde als 100 % gesetzt. Während steigende Mengen Holo- cytochrom c keine Verdrängung bewirkten, fand sich 50 % restlich gebundenes ^{14}C -Apocytochrom c bei einer Konzentration von 40 pmol unmarkiertem Apocytochrom c in dem Probenvolumen von 175 μl .

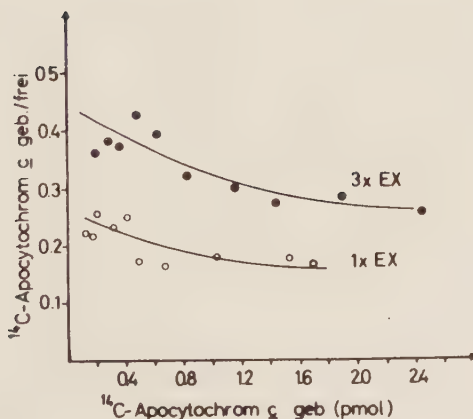


Abb. 12: Konzentrationsabhängigkeit hochaffiner ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindungsstellen an Liposomen mit rekonstituierten mitochondrialen Extrakten

Extrakt-Liposomen wurden wie oben beschrieben hergestellt und bei ansonsten gleichen Testbedingungen in Aliquots von entweder 6 μg (1xEX) oder 18 μg (3xEX) rekonstituierten Extraktproteins im liposomalen Bindungstest für ^{14}C -Apocytochrom c eingesetzt. Die resultierenden Bindungskurven waren parallelverschoben und zeigten für die hochaffine Bindung ($K_a = 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) etwa 1.8 bzw. 4.8 pmol Bindungsstellen.

signifikante in Liposomen rekonstituierbare Bindungsaktivität mehr. Dann wurde der Detergenzextrakt, der die Bindungsaktivität enthielt, gegen einen detergenzfreien Puffer dialysiert, und untersucht, ob die Bindungsaktivität nach Entzug des Detergenz durch die Dialyse noch löslich blieb. Nach Dialyse und Ultrazentrifugation bei $150000\text{ g}_{\text{av}}$ für eine Stunde befand sich die Bindungsaktivität nach wie vor in Lösung. Dieselbe Beobachtung wurde auch nach Entfernen des Detergenz durch Gelfiltration an Sephadex-G25 oder -G75 gemacht.

Die Rekonstitutionseffizienz des so solubilisierten Apocytochrom-c-bindenden Proteins war recht gut: Im Durchschnitt von fünf verschiedenen Präparationen wurden etwa 30 % des gesamten mitochondrialen Proteins extrahiert und 18 % in Asolectin-Liposomen rekonstituiert. Die Ausbeute rekonstituierbarer hochaffiner Bindungsstellen betrug 50-60 %.

Für den nächsten Isolierungsschritt wurde eine Ionenaustauschchromatographie konzipiert. Da die Bindungsaktivität an CM52-Cellulose gebunden wurde, bot sich als Durchlaufschritt für die Isolierung die Verwendung einer DE52-Cellulose-Säule an, was üblicherweise hohe Ausbeuten verspricht. Nach Aus-testen verschiedener pH-Bedingungen für diesen Chromatographieschritt wurde gefunden, daß bei pH 8,5 in 10 mM Tris-HCl die Masse der extrahierten mitochondrialen Proteine an die DE52-Cellulose gebunden wurde, während die hochaffine ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindungsaktivität im Durchlauf dieser Säule erschien. Eine Elution des gebundenen mitochondrialen Proteins mit 1 M NaCl und Rekonstitution dieser Fraktion nach Entsalzung in Asolectin-Liposomen zeigte, daß keine Bindungsaktivität mehr messbar war. Die aktive Durchlauffraktion der DE-Säule enthielt hauptsächlich 3 Proteine (siehe Abbildung 13): Gemäß SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ein 20kD-Protein, ein 18kD-Protein und - beweisbar durch Spektren und Reaktion mit spezifischen Antiseren - Holocytochrom c.

Für den folgenden Reinigungsschritt kam eine hydrophobe Chromatographie an Phenyl-Sepharose zur Anwendung. Die Bindungsaktivität konnte unter hohen Salzkonzentrationen (1 M NaCl) an das Säulenmaterial gebunden werden, wobei nur das 20kD-Protein an der Säule hängen blieb, das 18kD-Protein und das Holocytochrom c hingegen aber nicht gebunden wurden und nach Rekonstitution in Liposomen auch keine Bindungsaktivität aufwiesen. Das an die Phenyl-Sepharose gebundene 20kD-Protein konnte in einer Stufe bei niedrigen Salzkonzentrationen (50 mM NaCl) und in Gegenwart von Octylglykosid eluiert

werden und zeigte nach Rekonstitution die geforderte hochaffine Bindung von ^{14}C -Apocytochrom c.

Tabelle 2 gibt die Daten für die Isolierung der mitochondrialen

^{14}C -Apocytochrom-c-bindenden Aktivität wieder: In dieser typischen

Reinigung wurden durch Extraktion mit Detergenz etwa 60-70 % der gesamten mitochondrialen hochaffinen Bindungsstellen solubilisiert, aber nur etwa 25 % des mitochondrialen Proteins (alles bezogen auf Rekonstitution in Liposomen). DE52-Chromatographie führte zu einer 15fachen Anreicherung, der letzte Schritt über Phenyl-Sepharose ergab schließlich eine Ausbeute von 3.7 %. Abbildung 13 zeigt die Analyse der verschiedenen Isolierungsschritte in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Das Eluat der Phenyl-Sepharose-Säule enthielt als einziges Endprodukt das 20kD-Protein (apparentes Molekulargewicht in der Elektrophorese 20000 Dalton). Die Bindungsaktivität des in Liposomen rekonstituierten gereinigten Proteins verschiedener Präparationen war 7000-9000 pmol/mg Protein (siehe dazu auch Tabelle 1 und Abbildung 14). Dies entsprach somit einer Anreicherung von 80-100fach ausgehend von Mitochondrien. Eine theoretische Überlegung würde aber eine notwendige Anreicherung von 550-830fach nahelegen, wenn das Bindungsprotein als Monomer, oder 270-420fach, wenn es als Dimer agiert. Die Rekonstitutionseffizienz des isolierten 20kD-Proteins in Liposomen war gegenüber mitochondrialen Detergenzextrakten mit 10-20 % bezogen aufs Protein viel niedriger. Verlust authentischer Membranlipide während der Isolierung oder anderer Komponenten mögen die Ursache hierfür sein. Eine andere Möglichkeit wäre, daß durch die Isolierung ein Teil des Proteins derartig verändert wird, daß es seine Apocytochrom-c-Bindungsaktivität verliert.

Stufe	Volumen (ml)	Protein (mg)	Bindungsstellen (pmol)	Spezifische Bindung (pmol/mg)	Ausbeute (%)
1. Mitochondrien	-	2116	190440	90	100
2. Octylglykosidextrakt	70	408	114264	280	62
3. DE52-Durchlauf	150	3.8	13300	3500	7
4. Phenyl-Sepharose-Eluat	56	1	7000	7000	3.7

Tabelle 1: Reinigung des Apocytochrom-c-bindenden Proteins aus *Neurospora-crassa*-Mitochondrien

Die hier gezeigten Ergebnisse repräsentieren eine typische Isolierung ausgehend von 1 kg Hyphen (Feuchtgewicht). Apocytochrom-c-Bindung wurde für die Stufe 2 - 4 durch Rekonstitution der entsprechenden Fraktion in Asolectin-Liposomen bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry, die Werte für die Ausbeute beziehen sich auf die gemessene spezifische Bindung.

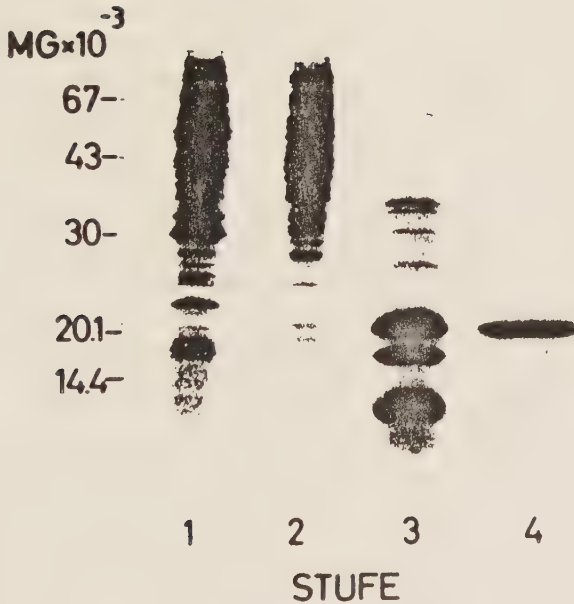


Abb.13: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der Reinigung und Isolierung des ^{14}C -Apocytochrom-c-bindenden Proteins

Von jeder Stufe der Isolierung wurden 30 μg Protein einer Elektrophorese auf einem 17.5%igen SDS-Polyacrylamidgel (siehe 2.11.1) unterworfen, und das Gel anschließend mit Coomassie-Blue R250 angefärbt. Stufe 1 = gesamte Mitochondrien, Stufe 2 = Octylglykosidextrakt aus Mitochondrien, Stufe 3 = DE-52-Cellulose-Durchlauffraktion, Stufe 4 = Phenyl-Sepharose-Eluat.

3.4 Charakterisierung des isolierten 20kD-Proteins

3.4.1 Bindung von ^{14}C -Apocytochrom c an das 20kD-Protein

Der Scatchard-Plot für die Bindungsanalyse von ^{14}C -Apocytochrom c an Liposomen, in die das isolierte 20kD-Protein rekonstituiert worden war, zeigte die gleichen Eigenschaften wie bei Mitochondrien und Extrakt-Liposomen (siehe Abbildung 14): Es wurde wiederum ein biphasischer Bindungskurvenverlauf erhalten, der sich in zwei verschiedene Bindungsaffinitäten auflösen ließ, wobei die dabei beobachtete niederaffine Bindung der von Kontroll-Liposomen, in die keinerlei Protein rekonstituiert worden war, entsprach. Diese niederaffine Bindung repräsentierte somit wohl die unspezifische Wechselwirkung des Apocytochrom c mit den Lipidmembranen.

Abbildung 15 zeigt, daß das an 20kD-Protein-Liposomen gebundene ^{14}C -Apocytochrom c in ähnlicher Weise wie für Mitochondrien und Extrakt-Liposomen spezifisch nur durch authentisches, unmarkiertes Apocytochrom c verdrängt werden kann: In Gegenwart von einem Überschuß an Holocytochrom c wurde eine 50%ige Verdrängung von vorgebundenem ^{14}C -Apocytochrom c bei Zugabe von etwa 200 pmol/ml unmarkiertem Apocytochrom c erzielt.

Ebenso wie für Mitochondrien und Extrakt-Liposomen war die Bindung von ^{14}C -Apocytochrom c an Liposomen, in die isoliertes 20kD-Protein rekonstituiert worden war, abhängig von der im Test eingesetzten Liposomenkonzentration (siehe Abbildung 16): Die dreifache Menge eingesetzter Liposomen sowohl für die Kontrolle ohne rekonstituiertes mitochondriales Protein, als auch für rekonstituiertes 20kD-Protein ergab ein in etwa dreifaches Signal im Scatchard-Plot.

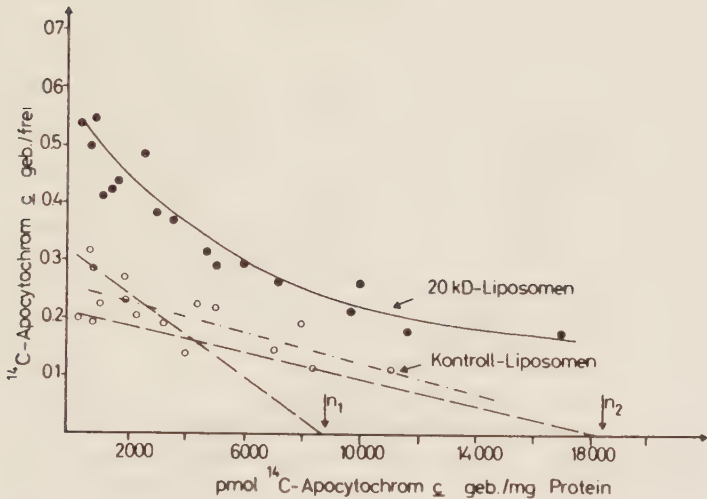


Abb.14: Scatchard-Plot der ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung an das in Liposomen rekonstituierte 20kD-Protein

Isoliertes 20kD-Protein (insgesamt 100 μg) wurde in Asolectin-Liposomen (siehe 2.14.2.1) rekonstituiert. Die Bindung von ^{14}C -Apocytochrom c wurde in einem Gesamtvolumen von 175 μl , die etwa 0.5 μg rekonstituiertes Protein enthielten, getestet (-●-). Zur Kontrolle wurden parallel Liposomen, die keinerlei Protein enthielten, präpariert und ebenso getestet (-○-). Die Auflösung der biphasischen Kurve in die zwei verschiedenen Bindungsaffinitäten ergab etwa 8800 hochaffine ($K_a = 1.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) und 18300 niederaffine ($K_a = 4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) Bindungsstellen pro mg rekonstituiertes Protein.

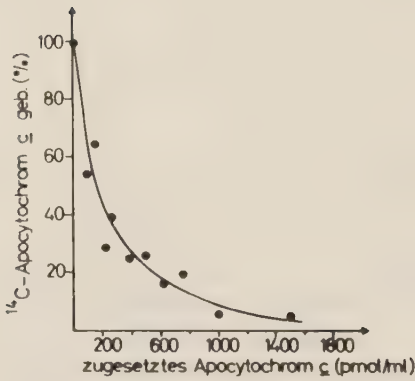


Abb.15: Kompetitive Verdrängung von ^{14}C -Apocytochrom c an Liposomen mit rekonstituiertem 20kD-Protein

Wie für das Experiment in Abbildung 11 beschrieben wurden pro mg rekonstituiertes 20kD-Protein 100 pmol ^{14}C -Apocytochrom c angebunden, die Liposomen reisoliert und gewaschen und nach Resuspension in liposomalen Bindungspuffer mit 1.8 nmol *Neurospora*-Holocytochrom c pro ml in Aliquots mit steigenden Mengen unmarkiertem Apocytochrom c für 25 Minuten bei 25°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Liposomen wurde das noch verbliebene gebundene ^{14}C -Apocytochrom c relativ zur 100%-Kontrolle (keine Zugabe von unmarkiertem Apocytochrom c) bestimmt.

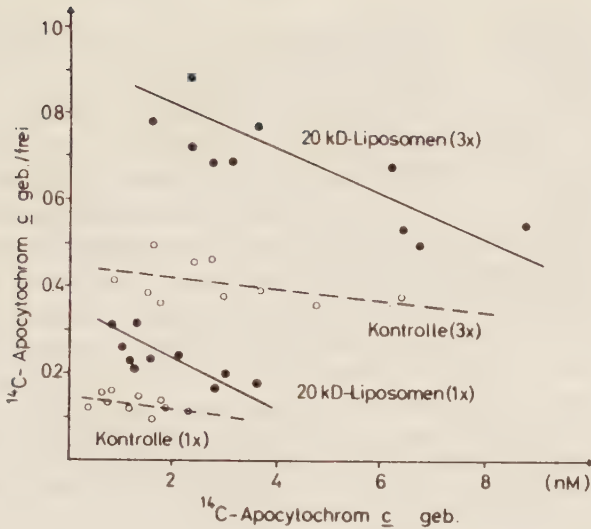


Abb.16: Abhängigkeit der hochaffinen ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung von der Konzentration an Liposomen mit rekonstituiertem 20kD-Protein

Insgesamt 200 μg isoliertes 20kD-Protein wurden in einem doppelten Ansatz in Asolectin-Liposomen rekonstituiert (siehe 2.14.2.1). Daneben wurde die gleiche Präparation für Liposomen, die keinerlei Protein enthielten, durchgeführt. Beide Liposomenpräparationen wurden letztendlich in 1.5 ml liposomalen Bindungspuffer resuspendiert und in 25 μl -Aliquots (1x) bzw. 75 μl -Aliquots (3x) in einem Gesamtvolumen von 175 μl mit steigenden Mengen ^{14}C -Apocytochrom c inkubiert. Für die Auswertung der erhaltenen Scatchard-Plots wurde, da ein eindeutig biphasischer Verlauf nicht konstruierbar war, der Einfachheit halber mittels linearer Regression die Anzahl der hochaffinen Bindungsstellen für die 20kD-Liposomen kalkuliert. Die somit unkorrigierten Werte ergaben für die 20kD-Liposomen (1x) 1.1 pmol/0.15 μg Protein hochaffine Bindungsstellen ($5.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), für die dreifache Menge 20kD-Liposomen (3x) 3.2 pmol/0.45 μg Protein ($5.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$). Dies entsprach somit der 2.9fachen Anzahl hochaffiner Bindungsstellen. Auch die Bindungskurven für die entsprechenden Kontroll-Liposomen waren um einen ähnlichen Faktor parallelverschoben.

3.4.2 Isoliertes 20kD-Protein kompetiert um die Bindung von ^{14}C -Apocytochrom c mit isolierten Mitochondrien

Ein weiteres Indiz für die Funktion des isolierten 20kD-Proteins, spezifisch Apocytochrom c zu binden, war die Möglichkeit, mit dem isolierten Protein die Bindung von ^{14}C -Apocytochrom c an Mitochondrien zu kompetieren (Abbildung 17). Das 20kD-Protein wurde dazu nach Umpuffern über Sephadex-G25-PD10-Säulen in den entsprechenden mitochondrialen Bindungspuffer in steigenden Konzentrationen dem Test für die ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung an isolierte Mitochondrien zugesetzt.

Die Zahl der bestimmten hochaffinen mitochondrialen Bindungsstellen bei gleichen Konzentrationen mitochondrialen Proteins im Ansatz sank mit steigenden Konzentrationen 20kD-Protein, was sich in einer Parallelverschiebung der Mitochondrienbindungskurve zu niedrigeren Zahlen hochaffiner Bindungsstellen ausdrückte (siehe Abbildung 17A). Eine Verminderung dieser Zahl hochaffiner Bindungsstellen um die Hälfte der verwendeten Kontrolle wurde bei einer 20kd-Protein-Konzentration von $6.2 \times 10^{-7} \text{ M}$ erreicht (siehe Abbildung 17B). Dieser Wert liegt etwa 2-3mal höher als theoretisch erwartet, wenn eine 1:1-Interaktion der beiden Moleküle zugrunde gelegt wird.

Wichtig für die Interpretation dieser Kompetition war der Beweis, daß es sich bei der Kompetition nicht um einen Effekt von restlichem Detergenz aus der Proteinisolierung auf die Mitochondrien handelte. Dazu wurden zwei Kontrollen durchgeführt: Erstens wurde die Wirkung von steigenden Mengen Octylglykosid auf die hochaffine Apocytochrom-c-Bindung an isolierte Mitochondrien untersucht, indem über Scatchard-Analysen für steigende Octylglykosidkonzentrationen im Testansatz die Zahl hochaffiner Bindungsstellen ermittelt wurde. Abbildung 18A zeigt das Ergebnis dieses Experimentes ausgedrückt in % Kontrolle ohne Detergenzzusatz im Test. Bei ungefähr 0.4 % (w/v) Octylglykosid in Test sind die hochaffinen Bindungsstellen um 30 % reduziert. Da das Volumen der in dem Experiment für Abbildung 17 eingesetzten 20kD-Protein-Lösung nur bis zu 10 % des Gesamttestvolumens betrug, müßte die Detergenzkonzentration in dieser Proteinpräparation, wenn es sich um einen reinen Detergenzeffekt bei der Kompetition handeln sollte, größer als 4 % (w/v) gewesen sein. Dies ist schon rein rechnerisch und auf Grund der bekannt guten Effizienz von Sephadex-G25 bei der Abtrennung von Octylglykosid aus Lösungen recht unwahrscheinlich. Zweitens wurde die

Octylglykosidkonzentration in der verwendeten 20kD-Protein-Präparation durch die Lyse von Schafserythrozyten ermittelt. Dazu wurde zunächst eine Eichkurve für die Lyse von Schafserythrozyten durch Octylglykosid über die Freisetzung von Hämoglobin erstellt (siehe Abbildung 18B). Ab 0.5 % (w/v) Detergenz im Ansatz war alles vorhandene Hämoglobin aus den Erythrozyten freigesetzt. 1.4 nM 20kD-Protein im Ansatz ergab keinerlei Freisetzung von Hämoglobin. Diese Experimente zusammengekommen zeigten, daß die Kompetition der mitochondrialen Apocytochrom-c-Bindung durch das isolierte 20kD-Protein nicht auf einen Effekt restlichen Detergenz auf die Intaktheit der verwendeten Mitochondrien zurückgeführt werden konnte.

3.4.3 Subzelluläre Lokalisierung des 20kD-Proteins

Die Verteilung des 20kD-Proteins nach Fraktionierung der Hyphen mit Hilfe der Percoll-Gradientenmethode wurde durch quantitative Immunpräzipitation des Proteins unter Verwendung eines spezifischen Antiserums, das gegen das isolierte Protein hergestellt worden war, durchgeführt (siehe 2.9 und 2.10.2). Etwa 40-50 % des zellulären 20kD-Proteins wurden in der Mitochondrienfraktion des Percollgradienten wiedergefunden (zur Methode siehe 2.3.3). ADP/ATP-Carrier als integrales Innenmembranprotein und Porin als ein Protein der Außenmembran wurden als nichtumverteilbare mitochondriale Markerproteine gemessen. Holocytochrom c, das teilweise mit der mitochondrialen Innenmembran assoziiert ist, zeigte relativ zum 20kD-Protein eine höhere mitochondriale spezifische Aktivität (siehe Abbildung 19), aber eine niedrigere verglichen mit ADP/ATP-Carrier und Porin. Andererseits ging aber auch ein kleiner Teil der matrixlokalisierten mitochondrialen Isocitrat-Dehydrogenase in die Cytosolfraktion verloren. Als interne Kontrolle für eine cytoplasmatische Kontamination der Mitochondrienbande des Percollgradienten wurde der Gehalt an Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase bestimmt: Mit etwa 2 % der Aktivität verglichen mit dem ADP/ATP-Carrier oder Porin war diese cytosolische Enzymaktivität in der Mitochondrienfraktion verschwindend gering. Zusammengefaßt zeigten diese Ergebnisse, daß das 20kD-Protein in der Tat ein mitochondriales Protein ist, das aber während der Zellfraktionierung relativ leicht aus den Mitochondrien freigesetzt wird.

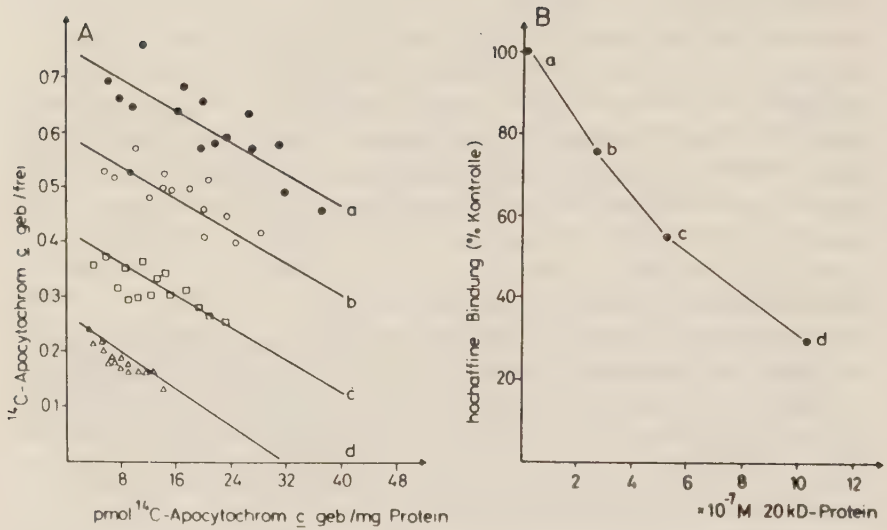


Abb.17: Konkurrenz mitochondrialer ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung durch das isolierte 20kD-Protein

^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung an isolierte Mitochondrien wurde wie in 2.14.1 beschrieben in Gegenwart von (a) 0, (b) 0.26, (c) 0.52 und (d) 1.04 nM 20kD-Protein analysiert. Das isolierte Protein wurde zuvor zweimal über Sephadex-G25 entsalzt und dann in den Mitochondrien-Bindungspuffer umgepuffert. Für die Auswertung der dabei erhaltenen Bindungskurven wurde vereinfachend über lineare Regression der hochaffinen Bindungsgeraden ohne die notwendige Korrektur der unspezifischen Bindung, bis zu der in diesem Experiment nicht heruntertitriert worden war, die Zahl der hochaffinen Bindungsstellen bestimmt: (a) 106 pmol/mg, (b) 82 pmol/mg, (c) 58 pmol/mg und (d) 32 pmol/mg mitochondrialen Proteins ($K_a = 3.4 - 3.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$). Abbildung 17A zeigt die Scatchard-Plots, Abbildung 17B die Auftragung der daraus ermittelten hochaffinen Bindungsstellen gegen die Konzentration des eingesetzten 20kD-Proteins, wobei die Kontrollmitochondrien-Bindung (a) 100 % gesetzt wurde.

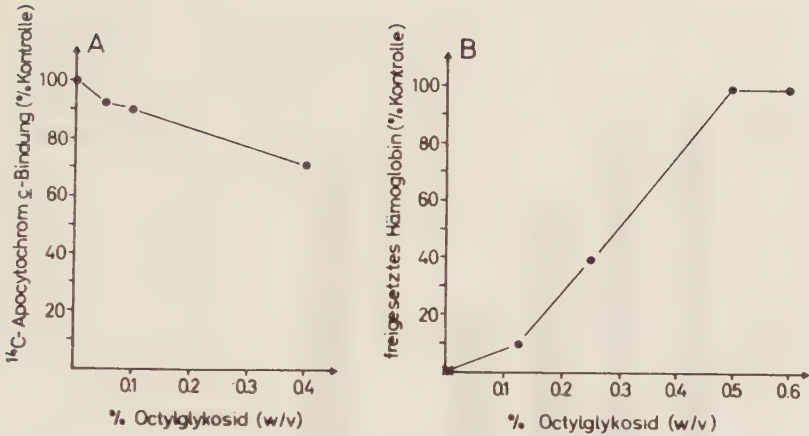


Abb.18: Kontrolle der für die Kompetition der mitochondrialen Apo-cytochrom-c-Bindung verwendeten 20kD-Protein-Präparation auf restlich enthaltenes Detergenz

Die Bindung von ^{14}C -Apocytochrom c an isolierte Mitochondrien wurde wie in 2.14.1 beschrieben in Gegenwart von 0, 0.05, 0.1 und 0.4 % (w/v) Octylglykosid im Bindungsansatz über Scatchard-Plots analysiert, und die dabei ermittelten Anzahlen hochaffiner Bindungsstellen ausgedrückt in % der Kontroll-Bindungskurve ohne zugesetztes Detergenz wurden gegen die jeweilige Octylglykosidkonzentration aufgetragen (A).

Über die Lyse von Schafserythrozyten wurde der Detergenzgehalt der verwendeten 20kD-Protein-Präparation ermittelt (B): 100 μl -weise wurden gewaschene Schafserythrozyten (Behring-Werke, Marburg) in einem Gesamtvolumen von 500 μl in physiologischer Kochsalzlösung mit 0, 0.125, 0.25, 0.5 und 0.6 % (w/v) Octylglykosid für 5 Minuten bei 25 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Erythrozyten wurde aus dem Überstand die Freisetzung von Hämoglobin bei 550 nm photometrisch verfolgt. Ab ungefähr 0.5 % Detergenz waren die eingesetzten Erythrozyten vollständig lysiert. 1.4 nM 20kD-Protein im Ansatz (X) ergab keinerlei messbare Freisetzung von Hämoglobin, was anzeigte, daß die verwendete Präparation detergenzfrei war, oder aber zumindest nur so wenig Detergenz enthielt, daß dies keine Auswirkung auf die Intaktheit der Mitochondrien im Kompetitionstest haben konnte.

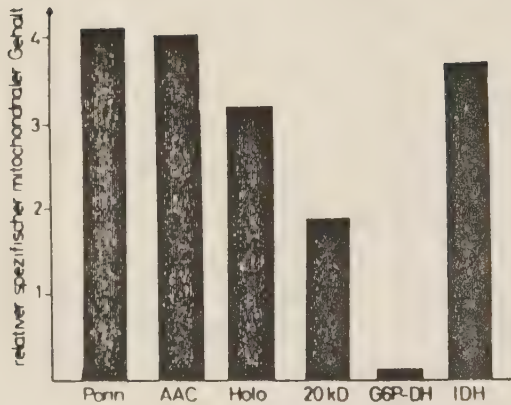


Abb.19: Subzelluläre Lokalisierung des 20kD-Proteins

Neurospora-Zellen in-vivo-markiert mit ^{35}S -Sulfat (siehe 2.2)

wurden im Percollgradienten fraktioniert, und Zellhomogenat (siehe 2.4.1) mit der mitochondrialen Gradientenfraktion in äquivalenten Volumina auf den Gehalt verschiedener Proteine hin verglichen: Das zu lokalisierende 20kD-Protein (20kD), das Innenmembranprotein ADP/ATP-Carrier (AAC), das Außenmembranprotein Porin (Porin), das im Intermembranraum lokalisierte Holo-cytochrom c (Holo) und das Matrixprotein Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) wurden mit Hilfe spezifischer Antiseren immunpräzipitiert (siehe 2.10.2) und nach Analyse der Immunpräzipitate in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durch Fluorographie und Densitometrie der erhaltenen Röntgenfilm-banden bei 546 nm quantifiziert. Relative mitochondriale spezifische Aktivitäten wurden berechnet, indem der spezifische Gehalt in den Mitochondrien durch den, der im Zellhomogenat bestimmt worden war, dividiert wurde. Als cytoplasmatischer Marker wurde die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (siehe 2.16.3) bestimmt.

Die Menge des 20kD-Proteins in Mitochondrien läßt sich ebenfalls durch quantitative Immunpräzipitation des Proteins aus *in-vivo*-markierten Zellen bestimmen und kalkulieren. Unter der Annahme, daß sich die ^{35}S -markierten Aminosäuren durchschnittlich verteilen und 50-60 % des Proteins bei der Fraktionierung der Zellen im Percollgradienten aus den Mitochondrien verloren gehen, stellt das 20kD-Protein etwa 0.25-0.3 % des gesamten mitochondrialen Proteins dar. Dies würde mit etwa 125-150 pmol/mg Mitochondrienprotein korrespondieren. Solange aber der exakte Cystein- und Methioningehalt des Proteins nicht bekannt ist, unterliegt diese Kalkulation noch einem Fehler. Aber dennoch scheint dieser Wert ganz gut mit der Anzahl der bestimmten hochaffinen mitochondrialen ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindungsstellen zu korrelieren.

3.4.4 Submitochondriale Lokalisierung des 20kD-Proteins

Für die submitochondriale Lokalisierung des 20kD-Proteins wurden isolierte Mitochondrien einer Digitonin-Fraktionierung unterzogen. Dieses Verfahren wurde schon erfolgreich für die Lokalisierung der mitochondrialen Matrix-Protease (Processing Peptidase), die Vorstufenproteine prozessiert, angewendet (Schmidt et al., 1984). Dazu wurden Mitochondrien mit steigenden Konzentrationen Digitonin versetzt, um sukzessive Außen- und Innenmembran zu solubilisieren. Dabei ist es dann möglich auch zwischen Matrix- und Intermembranraumbestandteilen zu unterscheiden. Adenylatkinase und Holocytochrom c, typische Proteine des Intermembranraumes, wurden zu 50 % schon bei sehr niedrigen Digitoninkonzentrationen von 0.08 % (w/v) solubilisiert (siehe Abbildung 20 C und D). Als nächstes wurde bei einer Konzentration von 0.23 % Digitonin das Außenmembranprotein Porin freigesetzt (Abbildung 20 B), zum Schluß das Innenmembranprotein ADP/ATP-Carrier bei etwa 0.27 % Digitonin (Abbildung 20 F). Das Matrixenzym Fumarase wurde zu 50 % bei etwa 0.25 % Digitonin solubilisiert (Abbildung 20 E). Das mitochondriale 20kD-Protein wurde **nach** Adenylatkinase und Holocytochrom c, aber **vor** Porin und Fumarase bei etwa 0.14 % Digitonin zu 50 % freigesetzt (Abbildung 20 A). Ein Einschluß von 100 mM NaCl in den Puffer, in welchem die Digitoninfraktionierung durchgeführt wurde, ergab keine Veränderung des hier gezeigten Fraktionierungsverhaltens. Daraus konnte geschlossen werden, daß das 20kD-Protein offensichtlich kein integrales Membranprotein ist, jedoch zum Intermembranraum hin orientiert sein muß als ein relativ leicht zu

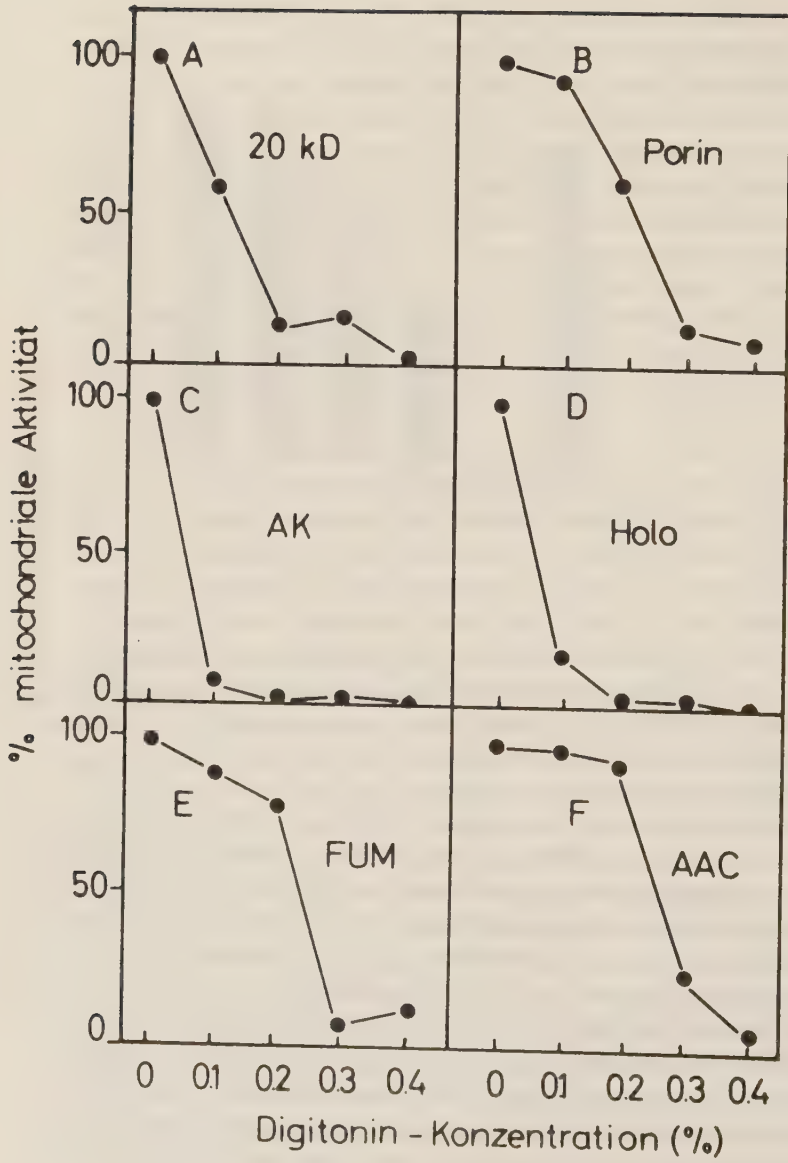


Abb.20: Submitochondriale Lokalisierung des 20kD-Proteins

Mitochondrien wurden wie beschrieben aus mit ^{35}S -Sulfat grundmarkierten Zellen isoliert und dann wie in 2.4.3 dargestellt mit steigenden Konzentrationen Digitonin behandelt. Freigesetzte mitochondriale Komponenten wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Dann wurden die dabei anfallenden mitochondrialen Pellets analysiert auf ihren Gehalt an 20kD-Protein und an verschiedenen Markerproteinen mit Hilfe immunologischer und enzymatischer Methoden (siehe 2.10.2, 2.16.1 und 2.16.2). Die Quantifizierung von Immunpräzipitaten wurde wie in Abbildung 19 beschrieben durchgeführt. Die Mengen der verschiedenen Proteine, die nach Digitoninbehandlung noch mit dem mitochondrialen Pellet assoziiert waren, wurden als % des Gehalts unbehandelter Mitochondrien ausgerechnet. A: 20kD-Protein (20kD); B: Porin (Porin); C: Adenylatkinase (AK); D: Holocytochrom c (Holo); E: Fumarase (Fum); F: ADP/ATP-Carrier (AAC).

solubilisierendes Protein. Dies stimmt gut mit der oben geschilderten Beobachtung, daß ein Teil des Proteins während der Zellaufarbeitung aus den Mitochondrien freigesetzt wird, überein. Auch war es weiterhin möglich, das Protein durch Beschallen von Mitochondrien zu solubilisieren.

3.4.5 Die Zahl hochaffiner mitochondrialer Bindungsstellen für Apocytochrom c korreliert mit dem Gehalt an 20kD-Protein

Der Gehalt an 20kD-Protein in isolierten Mitochondrien hing von der jeweiligen Aufschlußmethode für die Zellen ab: Im Percollgradienten isolierte Mitochondrien ergaben grundsätzlich die beste Ausbeute an 20kD-Protein und auch hochaffiner Bindungsstellen für ^{14}C -Apocytochrom c. Im Gegensatz dazu erwiesen sich Mitochondrien, die aus *Neurospora*-Protoplasten isoliert worden waren, als relativ ineffizient im Hinblick auf ihre hochaffine Apocytochrom-c-Bindung und sie enthielten auch deutlich weniger 20kD-Protein (etwa 10 pmol/mg Bindungsstellen bei etwa 0.02 % Anteil des 20kD-Proteins am Gesamtmitochondrienprotein).

Um an einer Mitochondrienpräparation die Abhängigkeit der hochaffinen Apocytochrom-c-Bindung von dem Gehalt an 20kD-Protein zu demonstrieren, wurden im Percollgradienten isolierte Mitochondrien einer hypotonen Behandlung durch Aufnehmen in Wasser unterzogen (siehe Abbildung 21). Durch diese Behandlung wurde aus den Mitochondrien etwa 42 % der Adenylatkinase, aber kaum messbare Mengen Fumarase freigesetzt. Hochaffine spezifische Bindungsstellen für Apocytochrom c bestimmt über Scatchard-Plots waren um etwa 45-50 % verglichen mit unbehandelten Mitochondrien reduziert (Abbildung 21A). Parallel dazu war der über Immunoblotting (siehe 2.10.13) gemessene Gehalt an 20kD-Protein um 45 % reduziert (Abbildung 21C). Die hypotone Behandlung der Mitochondrien führte aber nicht zu einer Abnahme der Bindung der ADP/ATP-Carrier-Vorstufe (Abbildung 21B). Diese Daten zusammengekommen zeigen, daß die Bindung von Apocytochrom c an isolierte Mitochondrien abhängig ist von Komponenten, die freigesetzt werden, wenn der Intermembranraum geöffnet wird. Die Bindung korrelierte dabei deutlich mit dem Gehalt an 20kD-Protein.

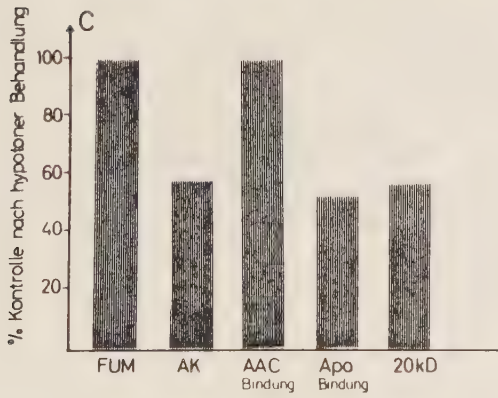
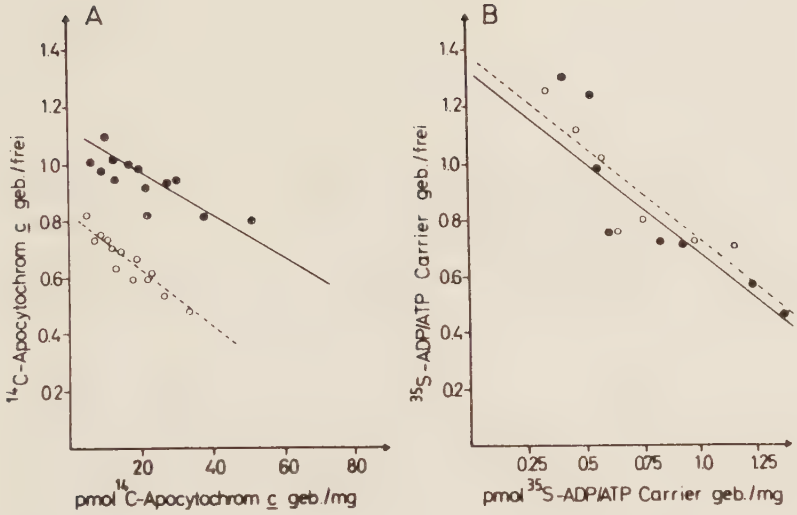


Abb.21: Korrelation der Apocytochrom-c-Bindung mit dem mitochondrialen Gehalt an 20kD-Protein

Mitochondrien wurden nach der Percoll-Methode (siehe 2.3.3) isoliert und mit einer Proteinkonzentration von 0.5 mg/ml in SMEP-Puffer (— ● —) oder in destilliertem Wasser mit 1 mM PMSF (- - - 0 - - -) resuspendiert. Nach Inkubation bei 4°C für 15 Minuten wurden die Mitochondrien reisoliert und in beiden Fällen in SMEP-Puffer resuspendiert, wobei mittels der Bradford-Proteinbestimmung (siehe 2.17.1) jeweils eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingestellt wurde. (A) zeigt die Scatchard-Analyse der ¹⁴C-Apocytochrom-c-Bindung: Die hochaffinen Bindungsstellen wurden ohne Korrektur um den niederaffinen Bindungsanteil durch lineare Regression auf 150 pmol/mg Mitochondrienprotein für die unbehandelten und auf 80 pmol/mg Protein für die hypoton behandelten Mitochondrien kalkuliert. (B) gibt das Ergebnis der Titration hochaffiner Bindungsstellen für die Vorstufe des ADP/ATP-Carriers wieder (siehe dazu 2.15): Dabei ergab eine lineare Regression der erhaltenen Meßpunkte für beide Arten von Mitochondrien etwa die gleiche Anzahl hochaffiner Bindungsstellen (1.93 bzw. 2.02 pmol/mg bei einer Assoziationskonstante von $5.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$). Diese Daten und die Ergebnisse der Quantifizierung von Fumarase (Fum) nach 2.16.2, Adenylatkinase (AK) nach 2.16.1 und 20kD-Protein (20kD) nach 2.10.3 sind zusammengefaßt in (C) dargestellt, wobei die Angaben für die verschiedenen bestimmten Komponenten hypoton behandelter Mitochondrien ausgedrückt wurden als % von unbehandelten Mitochondrien.

3.4.6 Vergleich der cytoplasmatischen Vorstufe des 20kD-Proteins mit der reifen mitochondrialen Form des Proteins

Kernkodierte mitochondriale Proteine können in einem zellfreien Proteinbiosynthesystem wie dem Kaninchenretikulozytenlysat unter Einsatz von isolierter poly(A⁺)mRNS des entsprechenden Organismus synthetisiert werden (siehe hierfür 2.6). Dies war für das 20kD-Protein ebenso der Fall, wie es Abbildung 22, Gelspur B beweist. Ein Vergleich des apparenten Molekulargewichtes in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit dem des reifen, aus grundmarkierten Mitochondrien immunpräzipitierten Proteins (siehe Abbildung 22, Gelspur A) zeigte keinen Unterschied, was nahe legt, daß das 20kD-Protein nicht als größere Vorstufe im Cytoplasma synthetisiert wird.

3.4.7 Import des 20kD-Proteins in die Mitochondrien *in-vivo*

In-vivo-*"pulse-chase"*-Experimente wurden durchgeführt, um eingehender festzustellen, ob sich das 20kD-Protein wie ein typisches mitochondriales Protein verhält, das im Cytosol synthetisiert und anschließend in die Mitochondrien importiert wird (siehe dazu Hallermayer et al., 1978). Ein 3-minütiger ³H-Leucin-Puls wurde einer *Neurospora*-Zellkultur gegeben und dann die cytoplasmatische Proteinbiosynthese durch Cycloheximid gestoppt. Das 20kD-Protein erschien nach einer gewissen Verzögerung in der Mitochondrienfraktion (Abbildung 23B). Zur Kontrolle des tatsächlichen Funktionierens des Importes von im Cytoplasma synthetisierten Vorstufen wurde die Untereinheit 9 der F₀-ATPase parallel verfolgt, weil es sich dabei um ein in den Mitochondrien prozessiertes Protein handelt, dessen in diesem Experiment quantifizierte reife Form (Abbildung 23 A1/A2) durch Abspaltung der Präsequenz deutlich von der Vorstufenform zu unterscheiden ist. Diese Ergebnisse unterstützten zudem die mitochondriale Lokalisierung des 20kD-Proteins.

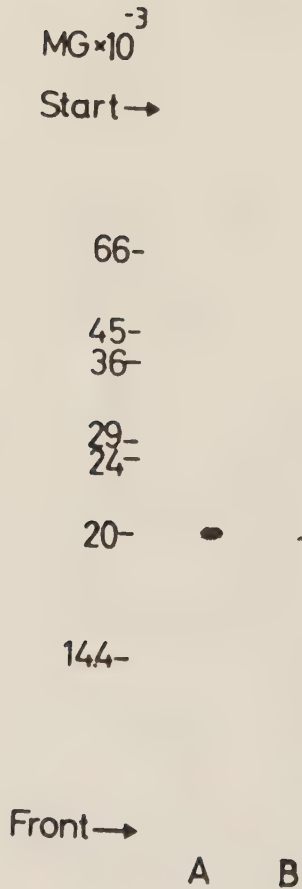


Abb.22: Vergleich der cytoplasmatischen Vorstufe des 20kD-Proteins mit dem reifen mitochondrialen Protein

(A) Das 20kD-Protein wurde aus *in-vivo* mit ^{35}S -Sulfat markierten Mitochondrien (10^6 TCA-fällbare cpm, isoliert nach 2.3.3) und (B) aus mit *Neurospora*-poly(A⁺)mRNS programmierten Kaninchenretikulozyten-lysat (10^6 TCA-fällbare cpm) immunpräzipitiert und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Autoradiographie analysiert.

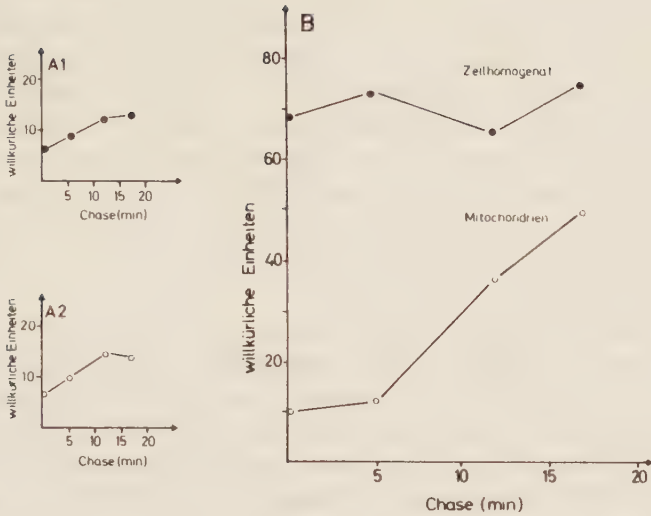


Abb.23: Import des 20kD-Proteins in die Mitochondrien in-vivo

Die näheren Bedingungen für dieses Experiment sind in 2.7 dargestellt. Nach einem 3-minütigen ^3H -Leucin-Puls wurde die cytoplasmatische Proteinsynthese durch Cycloheximid gestoppt. Die Hyphen wurden nach 0, 5, 12, oder 17 Minuten Chase bei 7°C geerntet und sofort nach der oben beschriebenen Percoll-Methode in Zellhomogenat und Mitochondrien fraktioniert. Äquivalente Volumina Homogenat und Mitochondrien wurden zur Feststellung des 20kD-Protein-Gehaltes immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Fluorographie auf Röntgenfilmen durch Densitometrieren der 20kD-Protein-Banden bei 546 nm quantifiziert (B).

Zur Kontrolle wurde auch die Untereinheit 9 der F_0 -ATPase immunpräzipitiert und die Verteilung der prozessierten, reifen Form dieses Proteins verfolgt (A1 und A2). Erwartungsgemäß fand sich dabei die aus dem Homogenat immunpräzipitierte Menge an reifer Untereinheit 9 auch in den Mitochondrien wieder.

— ● — Gehalt im Zellhomogenat, — ○ — Gehalt in Mitochondrien;

3.4.8 Zweidimensionale Gelelektrophorese des isolierten 20kD-Proteins

Wie in 2.11.2 beschrieben wurde eine zweidimensionale Gelelektrophorese mit dem isolierten 20kD-Protein durchgeführt, um zum einen die Reinheit und Homogenität der Präparation dieses Proteins festzustellen, zum anderen aber auch um in etwa den isoelektrischen Punkt des Proteins zu bestimmen. Anhand der verwendeten Markerproteine ergab sich für das 20kD-Protein ein isoelektrischer Punkt von etwa pH 8.5. Dies erklärt auch das Laufverhalten dieses Proteins in der DE52-Chromatographie, die bei einem pH von 8.5 durchgeführt worden war.

3.4.9 Proteasesensitivität des mitochondrialen 20kD-Proteins

Die Bindung von ^{14}C -Apocytochrom c an isolierte Mitochondrien erwies sich als sensitiv gegen Vorbehandlung der Mitochondrien mit Trypsin, wenn auch relativ hohe Trypsinkonzentrationen erforderlich waren, um die Bindung zu hemmen (siehe 3.1.2). Ebenso zeigten die Detergenzextrakte aus derartig vorbehandelten Mitochondrien nach Rekonstitution in Liposomen keine hochaffine Bindungsaktivität mehr.

So wurde mit Hilfe des spezifischen Antiserums gegen das 20kD-Protein versucht, diese Trypsinsensitivität der hochaffinen Apocytochrom-c-Bindung auch auf der Ebene des isolierten, Apocytochrom-c-bindenden 20kD-Proteins zu zeigen. Eine Analyse und Quantifizierung des 20kD-Proteins nach Behandlung von Mitochondrien mit steigenden Mengen an Protease und nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durch "Western Blotting" zeigte kein Verschwinden der 20kD-Protein-Bande sowohl in Mitochondrien selbst als auch in Octylglykosidextrakten aus diesen Mitochondrien. Auch konnte keine Änderung in dem Laufverhalten der Proteinbande in der SDS-Gelelektrophorese festgestellt werden (siehe Abbildung 25). Ebenso erwies sich das isolierte Protein als trypsinresistent (Abbildung 26, Gelspur 1-4). Nach Rekonstitution des isolierten Proteins in Liposomen jedoch wurde es schon bei Konzentrationen von 1 μg Trypsin pro ml vollständig verdaut (vergleiche Abbildung 26, Gelspur 5-12). Dies wies auf eine andere, trypsininsensitive Konformation des in Lipidmembranen rekonstituierten 20kD-Proteins hin. Zudem zeigte dies, die Intaktheit der liposomalen Membranen bei der genannten Trypsinkonzentration vorausgesetzt, daß das Protein derartig in oder an die Liposomen rekonstituiert sein muß, daß es von extern zugegebener Protease vollständig verdaut werden kann.

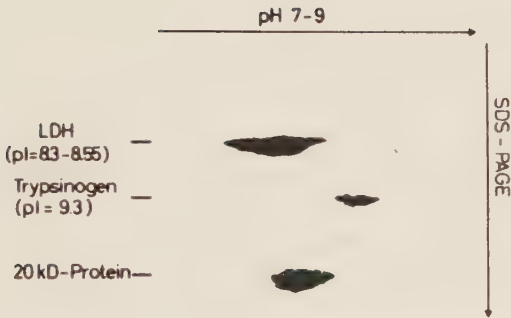


Abb.24: Zweidimensionale Gelelektrophorese des 20kD-Proteins

Zunächst wurden jeweils 50 µg isoliertes 20kD-Protein, LDH und Trypsinogen in der durch den Pfeil angegebenen Richtung in einem Röhrchengel einer isoelektrischen Fokussierung in einem pH-Bereich von 7-9 unterworfen. Dann wurde dieses Röhrchengel nach Aufpolymerisieren auf ein vertikales Platten-gel in der angegebenen Richtung in der zweiten Dimension über ein SDS-Poly-acryamidgel aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie-Blue R250 angefärbt. Das 20kD-Protein läuft dabei als ein Proteinsignal gemäß der beiden verwen-deten pH-Markerproteine etwa bei pH 8.5. Die Auftrennung nach dem Moleku-largewicht in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde durch zusätzlich aufgetragene Molekulargewichtsstandards kontrolliert.

Schließlich muß in diesem Zusammenhang noch vermerkt werden, daß es nach Trypsinvorbehandlung isolierter Mitochondrien mit 40 µg Trypsin/ml und mg Protein nicht mehr möglich gewesen ist, das Protein nach der beschriebenen Methode zu isolieren: In dem Durchlauf der DE-Chromatographie wurde kein 20kD-Protein mehr gefunden.

Diese Ergebnisse schienen zunächst etwas widersprüchlich zu sein: Die Apocytochrom-c-Bindung an Mitochondrien war trypsinsensitiv, das isolierte Apocytochrom-c-bindende Protein nicht oder zumindest nur nach erfolgter Rekonstitution in Liposomenmembranen. Es sollte aber an dieser Stelle schon bedacht werden, daß erstens derartige Proteasekonzentrationen, die notwendig waren, um die hochaffine Bindung zu zerstören, sicherlich schon dazu führen, daß die mitochondriale Außenmembran derartig angegriffen wird, daß das Trypsin auch den Intermembranraum der Mitochondrien erreichen kann. Zum anderen ist nicht auszuschließen, daß andere, hier nicht erfaßte Proteine der Mitochondrien, die involviert sind in der funktionellen Bindung von Apocytochrom c, durch die Protease betroffen werden. Drittens kann eine durch die Gelelektrophorese nicht sichtbar zu machende Veränderung des 20kD-Proteins (z.B. Abspaltung von nur wenigen Aminosäuren) immer noch im Bereich des Möglichen liegen. All dies ist später noch eingehender zu diskutieren.

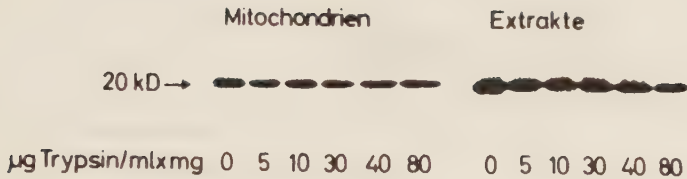


Abb.25: Trypsinsensitivität des 20kD-Proteins in Mitochondrien

Nach der Percoll-Methode isolierte Mitochondrien wurden mit 0, 10, 30, 40 und 80 µg Trypsin pro ml und mg Protein in SME-Puffer für 25 Minuten bei 25°C behandelt, und anschließend die Protease durch 800 µg Sojabohnen-Trypsininhibitor gestoppt (5 Minuten, 25°C). Die Mitochondrien wurden reisoliert und gewaschen und (A) je 25 µg mitochondriales Protein auf ein 17.5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die restlichen Mitochondrien wurden nach der beschriebenen Methode mit Octylglykosid extrahiert und (B) 12.5 µg dieser Extrakte ebenso über die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Die Detektion des 20kD-Proteins erfolgte durch "Western Blotting" mit ¹⁴C-Protein-A (siehe 2.10.3). Für Mitochondrien wie für deren Extrakte war keine signifikante Abnahme des 20kD-Protein-Signals nach Autoradiographie der Nitrocellulosemembranen feststellbar.

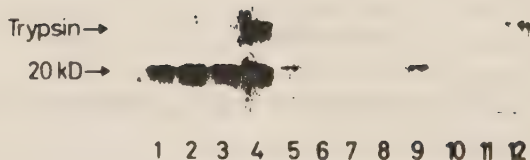


Abb.26: Trypsinsensitivität des isolierten 20kD-Proteins

Je 25 µg isoliertes 20kD-Protein wurden in 10 mM TEA pH 7.2 mit 0, 1, 5, 10 oder 40 µg Trypsin/ml für 25 Minuten bei 25°C behandelt. Die Proteaseaktivität wurde durch 1 mM TLCK und 1 mM PMSF gestoppt, und die Proteine auf Eis TCA-gefällt. Alle Ansätze wurden dann direkt in einem 17.5%igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Gelspur 1-4). Daneben wurden je 25 µg in Liposomen rekonstituiertes 20kD-Protein unter denselben Bedingungen mit 0-40 µg Trypsin behandelt. Nach Abstoppen der Protease wurden die Liposomen pelletiert. Gelspur 5-8 zeigt die Analyse der TCA-gefällten Überstände dieser Zentrifugation, Gelspur 9-12 die Liposomenpellets im Polyacrylamidgel. War das 20kD-Protein in Lösung vollständig resistent gegenüber zugegebener Protease, so wurde das in Liposomenmembranen rekonstituierte 20kD-Protein schon bei der niedrigsten getesteten Trypsinkonzentration verdaut und erschien auch nicht im Überstand nach Abzentrifugieren der Liposomen.

3.5 Versuche zur näheren Charakterisierung des Bindungsschrittes von Apocytochrom c im Verlauf des Importes in die Mitochondrien

3.5.1 Gebundenes Apocytochrom c ist membranintegriert

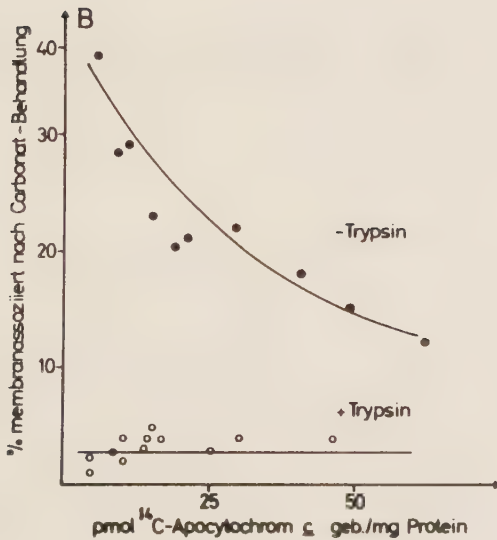
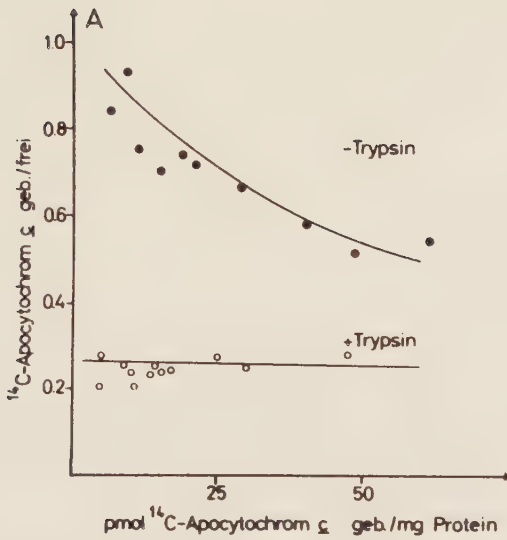
Wenn das isolierte 20kD-Protein in der Tat der Rezeptor für den Liganden Apocytochrom c sein soll, oder zumindest ein wesentlicher Teil davon, so muß gefordert werden, daß das Apocytochrom c die mitochondriale Außenmembran durchdringt, um das zum Intermembranraum hin orientierte 20kD-Protein zu erreichen. Um diesen transmembranen Zustand des an das 20kD-Protein gebundenen Apocytochrom c zeigen zu können, wurde eine alkalische Extraktion angewendet, die erlaubt, zwischen löslichen und membranständigen Komponenten zu unterscheiden (Steck und Yu, 1973; Fujiki et al., 1982). Trypsinbehandelte oder -unbehandelte Mitochondrien wurden in Gegenwart von Deuterohäm wie in 2.14.1 beschrieben mit steigenden Mengen ^{14}C -Apocytochrom c titriert (Abbildung 27A). Die Hälfte der jeweiligen Titrationsansätze wurde einer Natriumcarbonatextraktion unterzogen, wobei die Membranen aus dem Extraktionsansatz durch anschließende Ultrazentrifugation bei $100000\text{ g}_{\text{av}}$ pelletiert wurden. Ein bemerkenswert beträchtlicher Anteil des hochaffin gebundenen ^{14}C -Apocytochrom c fraktionierte dabei mit diesen Membranen (Abbildung 27B). Der Prozentanteil Apocytochrom c, der durch Carbonat nicht extrahiert werden konnte, sank mit sinkenden Gebunden/frei-Verhältnissen im Scatchard-Plot. Freies Apocytochrom c wurde unter den genannten Extraktionsbedingungen immer gelöst gefunden. Dies zeigt, daß spezifisch und hochaffin gebundenes Apocytochrom c, nicht aber unspezifisch und niederaffin gebundenes, in einer membranintegrierten Form vorliegen muß.

3.5.2 Die Interaktion des Apocytochrom c mit der Mitochondrienmembran und dem Importrezeptor ist abhängig von der Ionenstärke

In 3.1.4 wurde gezeigt, daß die Bindung von Apocytochrom c an isolierte Mitochondrien salzabhängig ist, d.h. mit steigenden Mengen Salz im Puffer vermehrt gebundenes Apocytochrom c abdissoziiert. Die Frage war nun, ob es sich dabei um spezifisch oder unspezifisch gebundenes Apocytochrom c handelt und inwieweit Ionen grundsätzlich die Bindungs- und Importstellen an Mitochondrien beeinflussen. Klar war dabei, daß Salz keine Bindungsstellen für Apocytochrom c solubilisiert, denn ob Mitochondrien in

SMEP-Puffer oder in 180 mM KCl isoliert worden waren, machte für die Zahl hochaffiner Bindungsstellen keinen Unterschied.

So wurden mitochondriale Bindungskurven von ^{14}C -Apocytochrom c im Vergleich zu dem üblichen saccharosehaltigen Puffer auch in einem Medium titriert, das anstelle von 250 mM Saccharose 180 mM KCl enthielt und damit iso-osmolar war. Abbildung 26 zeigt, daß in Gegenwart von 180 mM KCl die Bindung von Apocytochrom c an Mitochondrien, die unter denselben Salzbedingungen im Percollgradienten isoliert worden waren, drastisch reduziert war. Die relativ hohe Ionenstärke in diesem Puffer verhinderte offenbar die Interaktion des Apocytochrom c mit Mitochondrien und damit auch die hochaffine Bindung.



**Abb.27: Submitochondriale Lokalisierung des an Mitochondrien gebundenen
Apocytochrom c**

Mitochondrien wurden wie schon für andere Experimente beschrieben mit 40 µg Trypsin pro ml und mg Protein für 25 Minuten bei 25 °C in Gegenwart (-Trypsin) oder Abwesenheit (+Trypsin) von Trypsininhibitor (400 µg/ml und mg) inkubiert. Dann wurden die mitochondrialen Bindungskurven wie üblich mit der einen Hälfte der Ansätze titriert (A). Mit der anderen Hälfte wurde eine Carbonatextraktion durchgeführt: Zu diesem Zwecke wurden die Mitochondrien unter denselben Bedingungen wie für die Scatchard-Analyse der Apocytochrom-c-Bindung pelletiert, und diese Pellets dann in 1ml 1 % (w/v) Natriumcarbonat resuspendiert und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Membranen wurden anschließend für eine Stunde bei 100000 g_{av} und 4°C pelletiert (Beckman-Ti50-Rotor). Das noch mit den Membranen assoziierte ¹⁴C-Apocytochrom c wurde bezogen auf das zuvor insgesamt gebundene (B).

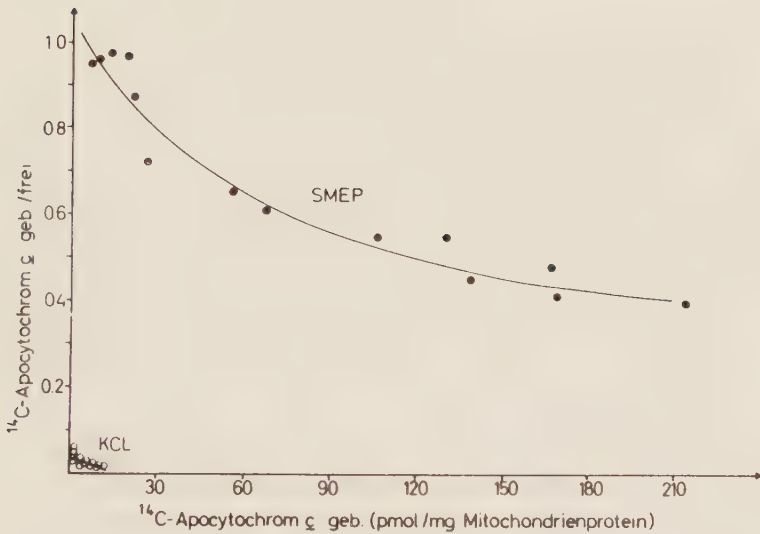


Abb.28: Bindung von ^{14}C -Apocytochrom c an Mitochondrien - Vergleich von SMEP- mit 180mM-KCl-Medium

Mitochondrien wurden wie für Abbildung 4 beschrieben isoliert und im mitochondrialen Bindungssystem eingesetzt und titriert (SMEP). Parallel dazu wurden Mitochondrien der gleichen Präparation nicht in dem üblichen mitochondrialen Bindungspuffer resuspendiert und gewaschen, sondern in einem Medium, das anstelle von 250 mM Saccharose 180 mM KCl enthielt. Auch für diese Mitochondrien wurde unter den genannten veränderten Pufferbedingungen bei ansonst identischen Testansätzen der Scatchard-Plot titriert (KCl).

4. DISKUSSION

4.1 Bindung von Apocytochrom c an Mitochondrien

4.1.1 Charakterisierung der hochaffinen spezifischen Bindung

Mit dem definierten ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindungssystem war es erstmals möglich, für ein mitochondriales, kernkodiertes Vorstufenprotein die Bindung an isolierte Mitochondrien genauer zu untersuchen. Nur ein derartiges System, in dem das Vorstufenprotein isoliert, chemisch rein und damit in exakt meßbarer Konzentration unter definierten kontrollierten Pufferbedingungen eingesetzt werden konnte, erlaubte die genauere Bestimmung von Bindungsparametern. Dabei war es im Falle der Apocytochrom-c-Bindung hilfreich, daß durch Hemmung der Häm-Anhängung über reversible Blockierung des dafür verantwortlichen Enzyms mit Hilfe des Häm-Analogs Deuterohäm selektiv die Bindung von Apocytochrom c untersucht werden konnte (siehe dazu auch Hennig und Neupert, 1981).

Die Titration mitochondrialer Bindungsstellen für ^{14}C -Apocytochrom c (Scatchard-Plots) war optimal in einem Puffer durchführbar, der eine niedrige Ionenstärke aufwies und dem pH-Optimum für die Bindung von 7.2 entsprach. Die Titrationskurven zeigten allgemein einen biphasischen Verlauf, wie er auch bei der Titration anderer zellulärer Rezeptoren zuvor beobachtet worden ist (Powell-Jones et al., 1980; Pollet et al., 1977). Die Auflösung derartig biphasischer Bindungskurven in einen hoch- und einen niederaffinen Bindungsanteil ist sicherlich eine methodische Vereinfachung der Analyse, denn es ist wohl denkbar, daß neben der geforderten spezifischen hochaffinen Bindung eines Liganden an seinen membranständigen Rezeptor mehrere verschiedene niederaffine Bindungsmöglichkeiten parallel existieren. Die Natur dieser niederaffinen Bindungen kann verschiedenster Art sein: Es könnte sich um Wechselwirkungen mit anderen Proteinen handeln, aber es sind auch Interaktionen mit Membranen und deren negativ geladenen Phospholipiden denkbar.

Daß der gemessene und berechnete hochaffine Bindungsanteil der ^{14}C -Apocytochrom-c-Wechselwirkung mit isolierten Mitochondrien spezifischer Art war, zeigte die Trypsinsensitivität dieses Anteils. Vorbehandlung von isolierten Mitochondrien mit 40 µg/ml und mg Mitochondrienprotein führte zu

einem Verlust der hochaffinen Bindung. Diese Art der Proteasevorbehandlung der Mitochondrien hemmte auch im zellfreien homologen Translationssystem von *Neurospora crassa* die Bindung von ^3H -markiertem Apocytochrom c an Mitochondrien in Gegenwart von Deuterohäm und dessen Konversion zu Holocytochrom c. Dies bewies zudem, daß die gemessenen hochaffinen Apocytochrom-c-Bindungsstellen involviert sind in den funktionellen Import des Proteins in die Mitochondrien. Die Zahl der hochaffinen mitochondrialen ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindungsstellen wurde für im Percollgradienten isolierte Mitochondrien mit 90 pmol/mg Protein bei einer Assoziationskonstante von $2.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ermittelt. Die gemessene Assoziationskonstante liegt größenordnungsmäßig im Bereich der von Hennig et al. (1983) publizierten Konzentration an unmarkiertem Apocytochrom c, das 50 % des aus dem zellfreien homologen Translationssystem an Mitochondrien gebundenem ^3H -Apocytochrom c verdrängt (240 pmol/ml).

Die Bindung für ^{14}C -Apocytochrom c an Mitochondrien war sehr spezifisch: Nur unmarkiertes Apocytochrom c, nicht aber Holocytochrom c war in der Lage das an Mitochondrien gebundene ^{14}C -Apocytochrom c zu verdrängen. Die für halbmaximale Verdrängung notwendige Konzentration an unmarkiertem Apocytochrom c lag mit 190 pmol/ml im schon diskutierten Bereich. Das Signal der hochaffinen Bindung im Scatchard-Plot erwies sich erwartungsgemäß abhängig von der im jeweiligen Testansatz vorhandenen Konzentration an Mitochondrien. Hingewiesen werden sollte an dieser Stelle nochmals auf den Befund, daß nur Apocytochrom c, das nach der Isolierung und/oder Methylierung einen Renaturierungszyklus durchlaufen hatte, bindungskompetent war. Schon zweimaliges Einfrieren einer Apocytochrom-c-Lösung führte zum Verlust der hochaffinen Bindungseigenschaft an Mitochondrien. Dies und die Tatsache, daß nur Apo-, nicht aber Holocytochrom c die Bindung an Mitochondrien kompetieren konnte, bewies, daß nur eine sich von der Konformation des Holocytochrom c unterscheidende definierte Form des Apocytochrom c in spezifischer Weise hochaffin an Mitochondrien binden kann (siehe dazu auch Fisher et al., 1973).

Zusammenfassend erwies sich das ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindungssystem als sehr geeignet für die Messung hochaffiner, trypsinsensitiver mitochondrialer Bindungsstellen, die alle Eigenschaften von Importrezeptoren erfüllten.

4.1.2 Vergleich mit den Bindungsstellen anderer mitochondrialer kernkodierter Vorstufenproteine

Schon Zimmermann et al. (1981) berichteten, daß Apocytochrom c offensichtlich einen Importweg in die Mitochondrien benutzt, der völlig verschieden ist von dem für ADP/ATP-Carrier oder der Untereinheit 9 der mitochondrialen ATPase. Auch Cytochrom c_1 und Porin nehmen einen anderen Weg (Teintze et al., 1982; Freitag et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Ein wesentlicher Unterschied zu anderen Vorstufenproteinen war, daß der Import unabhängig ist von der Energetisierung der mitochondrialen Innenmembran (Zimmermann und Neupert, 1983).

Für die mitochondrialen Bindungsstellen des ADP/ATP-Carriers, der Untereinheit 2 der mitochondrialen, Protonen translozierenden ATPase und des Außenmembranproteins Porin konnte gezeigt werden, daß diese sehr proteasesensitiv sind (Zwizinski et al., 1984; Pfaller et al., 1985). Zudem schienen diese Rezeptoren an der oder zumindest teilweise zur cytoplasmatischen Oberfläche der mitochondrialen Außenmembran orientiert zu sein. Denn bemerkenswerterweise waren diese bisher gemessenen Rezeptoren um den Faktor 10-20 sensitiver gegenüber Trypsinbehandlung als der Importrezeptor für Apocytochrom c (Zwizinski et al., 1984; Pfaller et al., 1985; Schmidt et al., 1985). Bindungsaffinitäten konnten während des Entstehens dieser Arbeit nur für den ADP/ATP-Carrier (siehe auch Schmidt et al., 1985) und dem Porin (Pfaller und Neupert, in Vorbereitung) gemessen werden. Für die Vorstufe des ADP/ATP-Carriers betrug die Zahl hochaffiner mitochondrialer Bindungsstellen ($K_a = 5.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) etwa 2 pmol/mg Mitochondrienprotein, für Porin ($K_a = 2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) etwa 10 pmol/mg Protein. Damit waren diese Zahlen an Bindungsstellen deutlich geringer als die hier bestimmten für Apocytochrom c, die Affinitäten jedoch hingegen höher. Dies zusammengekommen zeigte die sich von den genannten, bislang bestimmten mitochondrialen Rezeptoren unterscheidenden Eigenschaften des Apocytochrom-c-Rezeptors: Seine geringere Sensitivität gegenüber Protease, seine größere Anzahl auf den Mitochondrien bei gleichzeitig niedrigerer Affinität wies schon auf eine mögliche andersartige Lokalisierung in der Mitochondrienaußenmembran hin.

4.1.3 Biophysikalische Daten über die Interaktion von Apocytochrom c mit synthetischen Lipidmembranen

Zwei Arbeitsgruppen berichteten während des Entstehens dieser Arbeit über die Eigenschaft von Apocytochrom c, mit künstlichen Lipidmembranen zu interagieren (Dumont und Richards, 1984; Rietveld et al., 1983; Rietveld et al., 1984; Rietveld et al., 1985; Rietveld et al., in Druck). Hier eine kurze Zusammenfassung der in diesen Arbeiten beschriebenen Ergebnisse:

- Apocytochrom c zeigt signifikante Wechselwirkungen mit synthetischen Lipidmembranen. Besonders zu Membranen mit negativ geladenen Phospholipiden wie Phosphatidylserin gibt es messbare Affinitäten ($K_a = 1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Apocytochrom c perturbiert dabei die Lipide der Modellmembranen, erhöht deren Oberflächendruck und verhält sich in dieser Beziehung wie membranüberspannende Proteine wie zum Beispiel Glykophorin, Cytochrom-c-Oxidase oder auch Gramicidin.
- Apocytochrom c kann das Lipid-Bilayer teilweise überqueren, denn in die Lipidvesikel eingeschlossenes Trypsin spaltete das assoziierte Apocytochrom c. Diese über die eingeschlossene Protease bewiesene Translokation funktionierte am besten mit Vesikeln, die negativ geladene Phospholipide besaßen, und war langsamer als die gemessene Bindung von Apocytochrom c an diese Vesikel. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß ein C-terminales Peptid durch die Insertion in die Membran geschützt wird.
- Aus diesen Beobachtungen resultierend wurde folgendes Modell für die Rolle der Wechselwirkung von Apocytochrom c mit Membranen vorgeschlagen: Apocytochrom c bindet zunächst an die Membranen und interagiert dabei mit einer bestimmten Anzahl negativ geladener Phospholipide. Diese Wechselwirkung ist primär elektrostatisch, danach anschließend jedoch auch hydrophob. Die Protein-Lipid-Wechselwirkung ist dann begleitet von einer spontanen Insertion des Proteins in die Membran, was gleichzeitig eine Konformationsänderung im Protein hin zu einer mehr alpha-helikalen Struktur bedeutet. Damit sei die Insertion von Apocytochrom c in Membranen als ein Beispiel für die von Wickner 1980 vorgeschlagene Hypothese anzusehen, nach der die Konformationsänderung von Proteinen die treibende Kraft für den Transfer eines Proteins aus einer wässrigen Umgebung in eine Membran darstellt.

Zunächst einmal muß bezüglich der Bindung von Apocytochrom c an iso-

lierte Mitochondrien gesagt werden, daß die in den oben genannten Arbeiten dargestellten Wechselwirkungen von Apocytochrom c mit Modellmembranen mit deutlich niedrigerer Affinität stattfinden. Die ermittelte Assoziationskonstante von Apocytochrom c mit künstlichen Phospholipidmembranen kann allerhöchstens noch mit dem niederaffinen Bindungsteil der mitochondrialen Apocytochrom-c-Bindungskurve verglichen werden. Der Befund, daß hochaffin an Mitochondrien gebundenes Apocytochrom c in die Membran integriert ist, bestätigt allerdings die Fähigkeit des Proteins von selbst in Lipidmembranen zu inserieren. Es muß aber in diesem Zusammenhang deutlich darauf hingewiesen werden, daß diese die hochaffine Bindung begleitende Insertion eindeutig von einem Rezeptorprotein vermittelt wird, da sie proteasesensitiv ist. Daß die Wechselwirkung von Apocytochrom c zunächst elektrostatischer Natur sein soll, kann durch die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung gestützt werden, daß höhere Ionenstärken im Bindungspuffer die meßbare hochaffine Bindung von Apocytochrom c an Mitochondrien vermindert.

4.2 Das mitochondriale Apocytochrom-c-bindende 20kD-Protein

4.2.1 Der Bindungstest im mitochondrienfreien System

Durch Rekonstitution mitochondrialer Octylglykosidextrakte in Asolectin-Liposomen war es möglich, die trypsinsensitive hochaffine ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung in einem mitochondrienfreien System darzustellen. Die Bindung an derartige Extrakt-Liposomen zeigte dieselben spezifischen Eigenschaften wie die Mitochondrienbindung: Nur authentisches Apo-, nicht aber Holocytochrom c, konnte gebundenes ^{14}C -Apocytochrom c verdrängen. Das Signal der Bindungskurve war abhängig von der Konzentration an Extrakt-Liposomen im Ansatz. Die damit eröffnete Möglichkeit, die Bindung eines kernkodierten mitochondrialen Vorstufenproteins auch außerhalb von Mitochondrien messen zu können, erlaubte erst die angestrebte Isolierung des geforderten Rezeptorproteins. Der liposomale Bindungstest war zudem nicht derartig limitiert, wie es bislang allgemein der Fall ist für Bindungssysteme mitochondrialer Vorstufenproteine, die mit Translationssystemen arbeiten. Nur für die Vorstufe des Hefe-Cytochrom- b_2 ist bislang ein Bindungstest beschrieben worden, der mit Vesikeln arbeitet, die

aus detergentsolubilisierten Außenmembranen hergestellt worden waren (Riezmann et al., 1983). Diese Bindung an Außenmembranvesikel war insofern spezifisch, als sie proteasesensitiv war und nicht durch die prozessierte Vorstufe und cytosolische Enzyme gestört werden konnte. Dennoch war bedingt durch die Verwendung von Retikulozytenlysaten zur Darstellung von bindungskompetentem Vorstufenprotein die Möglichkeit, quantitative Aspekte dieser Bindung zu studieren, nicht gegeben.

4.2.2 Charakterisierung des 20kD-Proteins

Unter Verwendung des liposomalen ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindungstests konnte ein Protein mit folgenden Eigenschaften isoliert werden:

- apparentes Molekulargewicht im SDS-Polyacrylamidgel 20000,
- isoelektrischer Punkt bei etwa pH 8.5,
- mitochondrial lokalisiert, aber leicht löslich,
- im Intermembranraum von Mitochondrien mehr zur Außenmembran hin orientiert,
- rekonstituierbar in Asolectin-Liposomen,
- kernkodiert und ohne N-terminale Präsequenz im Cytosol translatiert und von dort in Mitochondrien importiert.

Das Protein aus Mitochondrien mit Octylglykosid extrahiert blieb nach Wegdialysieren des Detergenz löslich. Wegen seines alkalischen isoelektrischen Punktes lief es bei pH 8.5 durch eine DE52-Cellulose-Säule. Sein Verhalten bei Chromatographie an Phenyl-Sepharose war hydrophoberer Natur als das des extrem basischen Holocytochrom c, weil es im Gegensatz zu diesem bei hohen Salzkonzentrationen an das Säulenmaterial gebunden werden konnte. In löslicher Form war das Protein durch Trypsin im getesteten Konzentrationsbereich nicht verdaubar, zeigte sich aber nach Rekonstitution an Lipidmembranen als sehr empfindlich gegenüber der Proteasebehandlung. Mit 0.25-0.3 % Anteil am gesamten mitochondrialen Protein gehört es nicht gerade zu den selteneren Proteinen dieses Zellorganells, korreliert aber damit recht gut mit der an isolierten Mitochondrien gemessenen Zahl hochaffiner Apocytochrom-c-Bindungsstellen von 90 pmol/mg.

4.2.3 Spezifität und Selektivität der Apocytochrom-c-Bindung an das isolierte 20kD-Protein.

Nach Rekonstitution des isolierten 20kD-Proteins in Liposomen bindet dieses in spezifischer Weise Apocytochrom c: Es zeigte relativ zu Liposomen ohne rekonstituiertes Protein dieselbe Bindungsaffinität für ^{14}C -Apocytochrom c, die an Mitochondrien gemessen worden war. Dabei wurde wieder nur Apo- nicht aber Holocytochrom c gebunden; halbmaximale Verdrängung von vorangebundenem ^{14}C -Apocytochrom c erfolgte durch etwa 200 pmol/ml unmarkiertes Apocytochrom c, was den an Mitochondrien beobachteten Werten entsprach. Das hochaffine Signal der Bindungskurve war dann auch erwartungsgemäß abhängig von der in den Test eingesetzten Konzentration an 20kD-Liposomen. Die an derartigen 20kD-Protein-Liposomen meßbare Zahl hochaffiner Bindungsstellen für ^{14}C -Apocytochrom c lag mit 7000-9000 pmol/mg Protein und einem daraus resultierenden Anreicherungsfaktor von 80-100 deutlich unterhalb des rein rechnerisch bei einer 1:1-Interaktion von Apocytochrom c mit dem 20kD-Protein ermittelbaren Anreicherungsfaktor von 550-830fach. Mehrere Gründe dafür sind denkbar: Zunächst mag durch die Reinigung authentisches mitochondriales Außenmembranlipid verlorengehen, das die funktionelle Rekonstitution des Proteins an eine Lipidmembran beeinflussen mag. Weiterhin ist vorstellbar, daß bedingt durch die Isolierungsprozedur das 20kD-Protein an funktioneller Aktivität verliert. Immerhin kommt es im Verlauf der Reinigung mit hohen Salzkonzentrationen in Berührung und wird auch beispielsweise zum Gefriertrocknen eingefroren. Und schließlich kann auch wohl angenommen werden, daß das 20kD-Protein nur teilweise in funktioneller Position und struktureller Konformation rekonstituiert wird.

Die Bindung von Apocytochrom c an das isolierte 20kD-Protein war nicht nur nach Rekonstitution in Asolectin-Liposomen meßbar, sondern konnte auch mit dem gelösten Protein gezeigt werden: Es konkurrierte mit isolierten Mitochondrien um die Bindung von ^{14}C -Apocytochrom c. Halbmaximale Reduzierung hochaffiner mitochondrialer Bindungsstellen wurde bei einer Konzentration von 6.2×10^{-7} M 20kD-Protein im Testansatz beobachtet. Dieser Wert war damit 2-3mal höher als theoretisch erwartet. Die Gründe dafür mögen dieselben sein, die schon im Zusammenhang mit den 20kD-Protein-Liposomen diskutiert worden sind.

Zusammengefaßt konnte auf verschiedene Weise gezeigt werden, daß das 20kD-

Protein Apocytochrom c spezifisch und in gleicher Weise wie die untersuchten mitochondrialen Bindungsstellen erkennt und bindet.

4.2.4 Ist das 20kD-Protein der Importrezeptor für Apocytochrom c?

Sprechen die oben diskutierten Daten der spezifischen Apocytochrom-c-Bindung für eine Rolle des 20kD-Proteins als möglicher Importrezeptor, so existieren einige Eigenschaften dieses Proteins, die dem prinzipiell zu widersprechen scheinen: Erstens, das 20kD-Protein ist kein integrales Membranprotein, sondern ein mehr oder weniger lösliches Protein des Inter-membranraumes. Proteinrezeptoren z.B. der Plasmamembran sind typische integrale Membranproteine. Zweitens, wenn das 20kD-Protein zum Intermembranraum der Mitochondrien hin orientiert ist, bedeutet dies, daß Apocytochrom c zunächst die Außenmembran durchdringen muß, um das 20kD-Protein binden zu können. Bisher untersuchte Rezeptoren anderer importierter mitochondrialer Vorstufenproteine scheinen zumindest teilweise an der cytoplasmatischen Seite der Außenmembran lokalisiert zu sein (Zwizinski et al., 1984; Pfaller et al., 1985).

Zunächst einmal muß in Rechnung gestellt werden, daß die spezifische Apocytochrom-c-Bindung an Mitochondrien sich wie oben diskutiert von allen anderen bislang studierten Rezeptorbindungen mitochondrialer Vorstufenproteine unterscheidet: Die Zahl der Bindungsstellen ist mit 90 pmol/mg Protein deutlich (bis zu 50fach) höher, die Assoziationskonstante allerdings 10-100mal niedriger. Außerdem sind die gemessenen hochaffinen Apocytochrom-c-Bindungsstellen um den Faktor 10-20 unempfindlicher gegenüber Protease.

Aber nicht nur die Bindung von Apocytochrom c an Mitochondrien, sondern der gesamte Importmechanismus scheint sich von anderen bislang diskutierten Proteinen zu unterscheiden: Die Vorstufe des Cytochrom c muß nur die mitochondriale Außenmembran queren. Ein Membranpotential ist für den Import nicht notwendig. Zudem spielt die kovalente Anknüpfung der Häm-Gruppe eine entscheidende Rolle beim Transport des Vorstufenproteins über die Außenmembran (Hennig und Neupert, 1981).

Drei experimentelle Befunde in der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, daß sich dieser Bindungs- und Importmechanismus tatsächlich von dem anderer Proteine unterscheidet: Erstens, in Gegenwart von Deuteroham hochaffin gebundenes Apocytochrom c ist membranintegriert. Zweitens, die hochaffine

Bindung ist durch Veränderung der Ionenstärke im Bindungspuffer im Gegensatz zu bislang gemessenen Rezeptoren (Pfanner und Neupert, 1985; Pfaller und Neupert, in Vorbereitung) beeinflussbar. Drittens, die Anzahl der Bindungsstellen wird bei hypotoner Behandlung der isolierten Mitochondrien im gleichen Maße vermindert, wie Intermembranraumkomponenten freigesetzt werden. Dabei korreliert die Abnahme der gemessenen hochaffinen Bindungsstellen an hypoton behandelten Mitochondrien mit der Freisetzung von 20kD-Protein aus dem Intermembranraum.

Angesichts der referierten Befunde über die Wechselwirkung von Apocytochrom c mit Lipidmembranen kann es durchaus das 20kD-Protein sein, das an der Innenseite der Außenmembran sitzend die offensichtlich relativ niedrige Tendenz des Apocytochrom c, spontan in Lipidmembranen zu inserieren, in spezifischer Weise erhöht. Damit ist das Konzept eines nicht-membranständigen Rezeptors denkbar. Und damit ist möglicherweise auch die im Vergleich zu anderen bislang untersuchten Vorstufenproteinen hohe Bindungsstellenzahl erklärlich: Erstens, der Import von Apocytochrom c in die Mitochondrien würde als Anfangsschritt die spontane Insertion in die Lipiddoppelschicht der Außenmembran voraussetzen. Damit stellt dies einen völlig anderen Mechanismus dar als die Bindung anderer Vorstufenproteine an Oberflächenrezeptoren der Außenmembran, der eine Membranquerung über Kontaktstellen von Außen- und Innenmembran folgt (Schleyer und Neupert, 1985). Zweitens ist vorstellbar, daß das 20kD-Protein noch zusätzliche Funktionen besitzt, da ja die Häm-Anhängung nach der Insertion in die Außenmembran erfolgen muß, und die mit der Konformationsänderung verbundene Änderung der freien Energie dazu genutzt werden könnte, das gebundene Cytochrom c vollständig über die Außenmembran zu translozieren. Und drittens gibt es ja auch andere Proteine, die wie das Cytochrom c nur über die mitochondriale Außenmembran transportiert werden müssen und keinem "Umweg-Mechanismus" über die Innenmembran unterliegen, wie er beispielsweise für die Cytochrom-c-Peroxidase oder das Cytochrom b_2 vorgeschlagen worden ist (Kaput et al., 1982; Gasser et al., 1983). Diese anderen Proteine könnten zumindest teilweise dem Cytochrom-c-Importweg folgen. Kandidaten hierfür wären z.B. Vorstufen von Intermembranraumproteinen, die keine Präsequenz besitzen, wie Adenylatkinase (Watanabe und Kubo, 1982), ein Isoenzym der Cu/Zn-Superoxiddismutase (Robinson und Neupert, unveröffentlichte Ergebnisse) oder auch das 20kD-Protein selber.

Die Frage bleibt natürlich, ob das 20kD-Protein die einzige Komponente ist, die in der spezifischen Erkennung des Apocytochrom c durch Mitochondrien involviert ist. Es ist nicht auszuschließen, daß das 20kD-Protein im Verbund mit anderen Proteinen agiert, die dann z.B. entscheidende Aufgaben bei der Häm-Anhängung wahrnehmen. Erste vorläufige Ergebnisse über die mitochondriale Cytochrom-c-Häm-Lyase sind publiziert worden (Taniuchi et al., 1983; Visco et al., 1985), Daten über die genaue Lokalisierung dieses Enzyms sind aber noch nicht verfügbar. Man könnte zudem auch fragen, ob das 20kD-Protein wirklich das Protein ist, das den ersten spezifischen Erkennungsschritt für das Apocytochrom c leistet, oder ob z.B. ein Rezeptor mit höherer Affinität aber geringerer Zahl als für das 20kD-Protein bestimmt auf der Oberfläche der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert das Apocytochrom c in die Membran hineinlenkt. Allerdings ist es dabei schwer vorstellbar, wie das Apocytochrom c dann von dieser hochaffinen Bindungsstelle zu einer Bindungsstelle niedrigerer Affinität freigesetzt werden kann. Zudem wären diese hypothetischen Membranoberflächenbindungsstellen wegen ihrer offensichtlich geringeren Sensitivität gegenüber Proteasen völlig verschieden von den bislang gemessenen Importrezeptoren, die alle mehr oder weniger sehr empfindlich gegenüber Proteasen sind.

4.3 Hypothetischer Mechanismus des Imports von Apocytochrom c in die Mitochondrien

Unter Einbeziehung aller in dieser Arbeit vorgestellten und diskutierten Daten läßt sich folgender Importmechanismus für Cytochrom c in die Mitochondrien annehmen:

- Apocytochrom c wird als hämfreies Vorstufenprotein an freien cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert und ins Cytosol entlassen.
- Posttranslational interagiert es dann spontan mit den negativ geladenen Phospholipiden der mitochondrialen Außenmembran.
- Durch hydrophobe Wechselwirkung mit den Membranlipiden ist es in der Lage, in die Membran einzudringen. Es wird dabei durch das an der Innenseite der Außenmembran agierende 20kD-Protein spezifisch erkannt und in der Membran festgehalten. Wegen der hohen Affinität des 20kD-Proteins zum Apocytochrom c ist dies der entscheidende Schritt in der Membranwahl

und Membranspezifität von Apocytochrom c.

- Die Insertion in die Außenmembran durch Interaktion mit dem 20kD-Protein bringt das Apocytochrom c in einen konformativen Zustand, der Voraussetzung für die sich anschließende Häm-Anhängung ist. Die Reaktion der Häm-Lyase ist streng gekoppelt an diese durch das 20kD-Protein vermittelte Insertion des Apocytochrom c in die Außenmembran.
- Im folgenden Schritt wird die Häm-Gruppe enzymatisch und kovalent an das Apocytochrom c gekoppelt. Die dabei notwendigerweise erfolgende Konformationsänderung der Polypeptidkette liefert die erforderliche Energie, um das Protein vollständig über die Außenmembran zu translozieren. Das so gebildete Holocytochrom c nimmt dann seine funktionelle Position in der Atmungskette an der Außenseite der mitochondrialen Innenmembran ein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Apocytochrom c, hergestellt durch chemische Abspaltung der Häm-Gruppe aus isoliertem Holocytochrom c, kann durch reduktive Methylierung mit ^{14}C -Formaldehyd radioaktiv markiert werden. Diese Modifizierung des Proteins beeinflusst nicht seine Eigenschaft, als Vorstufenprotein von Mitochondrien spezifisch erkannt, gebunden und importiert zu werden.
2. Mit Hilfe dieses ^{14}C -markierten Apocytochrom c ist es erstmals möglich, die Bindung eines kernkodierten mitochondrialen Vorstufenproteins an isolierte Mitochondrien in einem definierten System zu untersuchen.
3. Unter Hemmung des weiteren Importschrittes und der Konversion des Apocytochrom c zu Holocytochrom c durch das Häm-Analoge Deuterohäm lassen sich für die hochaffine ^{14}C -Apocytochrom-c-Bindung an Mitochondrien folgende Parameter ermitteln:
Assoziationskonstante $K_a = 2.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$
Zahl der hochaffinen Bindungsstellen 90 pmol/mg.
4. Die gemessene hochaffine Bindung ist trypsinsensitiv und spezifisch für Apocytochrom c, denn nur unmarkiertes Apocytochrom c, nicht aber Holocytochrom c ist in der Lage, gebundenes ^{14}C -Apocytochrom c zu verdrängen. 180 mM KCl im Bindungspuffer verhindert die hochaffine Bindung, da offenbar die notwendige elektrostatische Interaktion von Apocytochrom c mit der Außenmembran der Mitochondrien vermindert wird. Hochaffin gebundenes Apocytochrom c ist membranintegriert, da es nicht mehr mit 1 % Carbonat extrahiert werden kann.
5. Diese hochaffine, trypsinsensitive und spezifische Aktivität der Apocytochrom-c-Bindung kann in Asolectin-Liposomen rekonstituiert werden nach ihrer Extraktion aus Mitochondrien mit Octylglykosid. Die Bindung von ^{14}C -Apocytochrom c an diese Extrakt-Liposomen zeigt typische Eigenschaften der Bindung an Mitochondrien. Damit war ein mitochondrienfreier Test für die Isolierung dieser Bindungsaktivität verfügbar.

6. Mit diesem Test wurde ein Protein aus Mitochondrien isoliert, das nach Rekonstitution in Asolectin-Liposomen die Eigenschaften der mitochondrialen hochaffinen Bindung aufwies. Das Protein hat ein apparentes Molekulargewicht von 20kD entsprechend der Wanderungsgeschwindigkeit in der SDS-Gelelektrophorese. Es zeigte sich, daß es im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert und relativ leicht solubilisierbar ist. Es wird im Cytoplasma der Zelle ohne N-terminale Präsequenz an freien Ribosomen synthetisiert und posttranslational in die Mitochondrien importiert. Das solubilisierete 20kD-Protein konkurriert mit ^{14}C -Apocytochrom c um die Bindung an isolierte Mitochondrien. Offenbar kann es auch in diesem Zustand Apocytochrom c erkennen und binden.

7. Die Zahl hochaffiner mitochondrialer Bindungsstellen für Apocytochrom c korreliert mit dem 20kD-Protein-Gehalt der Mitochondrien. In dem Maße wie 20kD-Protein durch hypotone Behandlung von Mitochondrien aus dem Intermembranraum freigesetzt wird, verringert sich die Zahl der hochaffinen Apocytochrom-c-Bindungsstellen, während z.B. die Zahl von ADP/ATP-Carrier-Bindungsstellen unverändert bleibt.

8. Diese Befunde legen nahe, daß mit dem 20kD-Protein zumindest eine Komponente des spezifischen mitochondrialen Erkennungs- und Importsystems für Apocytochrom c isoliert wurde. Der Mechanismus des Importes von Apocytochrom c in die Mitochondrien unterscheidet sich somit wesentlich von dem anderer Vorstufenproteine:

Apocytochrom c muß bei der Interaktion mit Mitochondrien und den darin enthaltenen hochaffinen Bindungsstellen zuerst in die Außenmembran inserieren. Diese Fähigkeit des Apocytochrom c wird auch durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt, die die Bindung an und die Insertion in Modellmembranen demonstrierten. Dieser grundlegende Mechanismus mag auch eine Erklärung dafür sein, daß die hochaffinen spezifischen Apocytochrom-c-Bindungsstellen im Gegensatz zu bislang untersuchten Rezeptoren mitochondrialer Vorstufenproteine von größerer Anzahl, niedrigerer Affinität und geringerer Proteasesensitivität sind.

Eine Funktion des 20kD-Proteins im Mechanismus der Häm-Anhängung an das Apocytochrom c ist in Betracht zu ziehen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Ambler, R.P., und Wynn, M. (1973).

"The amino acid sequence of cytochromes c_{551} from three species of *Pseudomonas*".

Biochem. J. **131**, 485-498

Ames, G.F.-L., und Nikaido, K. (1976).

"Two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins".

Biochemistry **15**, 616-623

Bergmeyer, H.V., Gawehn, K., und Grassl, M. 1970.

in "Methoden der enzymatischen Analyse."

Verlag Chemie, Weinheim

Blobel, G., und Dobberstein, B. (1975).

"Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma."

J. Cell Biol. **67**, 835-851

Böhni, P.C., Daum, G., und Schatz, G. (1983).

"Import of proteins into mitochondria. Partial purification of a matrix localized protease involved in cleavage of mitochondrial precursor polypeptides."

J. Biol. Chem. **258**, 4937-4943

Bradford, M.M. (1976).

"A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding."

Anal. Biochem. **72**, 248-254

Brunner, J., Stobel, P., und Hauser, H. (1976).

"Single bilayer vesicles prepared without sonication. Physicochemical properties."

Biochim. Biophys. Acta **453**, 323-331

Burnette, W.N. (1981).

"Western Blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated Protein A."

Anal. Biochem. **121**, 195-203

Chua, N.-H., und Schmidt, G.W. (1979).

"Transport of proteins into mitochondria and chloroplasts."

J. Cell. Biol. **81**, 461-483

Daum, G., Gasser, S.M., und Schatz, G. (1982).

Transport of proteins into mitochondria. Energy-dependent, two-step processing of the intermembrane space enzyme cytochrome b_2 by isolated yeast mitochondria."

J. Biol. Chem. **257**, 13075-13080

Dottavio-Martin, D., und Ravel, J.M. (1978).

"Radiolabelling of proteins by reductive alkylation with ^{14}C -formaldehyde and sodium cyanoborohydride."

Anal. Biochem. **87**, 562-565

Douglas, M.G., Geller, B.L., und Emr, S.D. (1984).

"Intracellular targeting and import of an F_1 -ATPase β -subunit- β -galactosidase hybrid protein into yeast mitochondria."

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**, 3983-3987

Dumont, M.E., und Richards, F.M. (1984).

"Insertion of apocytochrome c into lipid vesicles."

J. Biol. Chem. **259**, 4147-4156

Ernster, L., und Schatz, G. (1981).

"Mitochondria: A historical review."

J. Cell. Biol. **91**, 227s-255s

Fisher, W.R., Taniuchi, H., und Anfinsen, C.B. (1973).

"On the role of heme in the formation of the structure of cytochrome c."

J. Biol. Chem. **248**, 3188-3195

Freitag, H., Janes, M., und Neupert, W. (1982).

"Biosynthesis of mitochondrial porin and insertion into the outer mitochondrial membrane of *Neurospora crassa*."

Eur. J. Biochem. **126**, 197-202

Fujiki, Y., Hubbord, A.L., Fowler, S., und Lazarow, P.B. (1982).

"Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: Application to endoplasmic reticulum."

J. Cell. Biol. **93**, 97-102

Gasser, S.M., Ohashi, A., Daum, G., Böhni, P.C., Gibson, J., Reid, G.A., Yonetani, T., und Schatz, G. (1982).

"Imported mitochondrial proteins cytochrome b_2 and cytochrome c_1 are processed in two steps."

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 267-271

Gasser, S.M., und Schatz, G. (1983).

"Import of proteins into mitochondria: In vitro studies on the biogenesis of the outer membrane."

J. Biol. Chem. **258**, 3427-3430

Gilbert, J.M., und Anderson, W.F. (1971).

"tRNA dependent cell-free hemoglobin synthesis."

Meth. Enzymol. **XX**, 542-549

Gilmore, R., Blobel, G., und Walter, P. (1982).

"Protein translocation across the endoplasmic reticulum. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the recognition particle."

J. Cell. Biol. **95**, 463-469

Hallermayer, G., Zimmermann, R., und Neupert, W. (1977).

"Kinetic studies on the transport of cytoplasmically synthesized proteins into the mitochondria in intact cells of **Neurospora crassa**."

Eur. J. Biochem. **81**, 523-532

Harmey, M.A., Hallermayer, G., Korb, H., und Neupert, W. (1977).

"Transport of cytoplasmically synthesized proteins into mitochondria in a cell free system from **Neurospora crassa**."

Eur. J. Biochem. **81**, 533-544

Hennig, B., und Neupert, W. (1981).

"Assembly of cytochrome c. Apocytochrome c is bound to specific sites on mitochondria before its conversion to holocytochrome c."

Eur. J. Biochem. **121**, 203-212

Hennig, B., Köhler, H., und Neupert, W. (1983).

"Receptor sites involved in posttranslational transport of apocytochrome c into mitochondria. Specificity, affinity and number of sites."

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 4963-4967

Hennig, B., und Neupert, W. (1983).

"Biogenesis of cytochrome c in **Neurospora crassa**."

Meth. Enzymol. **97**, 261-274

Horwich, A.L., Kalousek, F., Mellman, I., und Rosenberg, L.E. (1985).

"A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein."

EMBO J. **4**, 1129-1135

Hunt, T., und Jackson, R.J. (1974).

"The rabbit reticulocyte lysate as a system for studying mRNA."
in "Modern trends in human leucaemia. Biological, biochemical and
virological aspects." (Neth, R., Gallo, R.C., Spiegelman, S., und
Stohlmann, F.jr. eds.)

J. F. Lehmannns Verlag München, Seite 300-307

Hurt, E.C., Pesold-Hurt, B., und Schatz, G. (1984a).

"The aminoterminal region of an imported mitochondrial precursor
polypeptide can direct cytoplasmic dihydrofolate reductase into
mitochondrial matrix."

EMBO J. **3**, 3149-3156

Hurt, E.C., Pesold-Hurt, B., und Schatz, G. (1984b).

"The cleavable prepiece of an imported mitochondrial protein is sufficient
to direct cytosolic dihydrofolate reductase into the mitochondrial
matrix."

FEBS Lett. **178**, 306-310

Kanarek, L., und Hill, R.L. (1964).

"The preparation and characterization of fumarase from swine heart
muscle."

J. Biol. Chem. **239**, 4202-4206

Kaput, J., Goltz, S., und Blobel, G. (1982).

"Nucleotide sequence of the yeast nuclear gene for cytochrome c
peroxidase precursor. Functional implication of the pre-sequence for
protein transport into mitochondria."

J. Biol. Chem. **257**, 15054-15058

Kirby, K.S. (1968).

"Isolation of nucleic acids with phenolic solvents."

Meth. Enzymol. **XIIB**, 87-99

Korb, H., und Neupert, W. (1978).

"Biogenesis of cytochrome c in *Neurospora crassa*."

Eur. J. Biochem. **91**, 609-620

Laemmli, U.K. (1970).

"Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4."

Nature **227**, 680-685

Leaver, C.J., und Ingle, J. (1971).

"The molecular integrity of chloroplasts ribosomal ribonucleic acid."

Biochem. J. **123**, 235-243

Locker, J., und Rabinowitz, M. (1979).

"An overview of mitochondrial nucleic acids and biogenesis."

Meth. Enzymol. **LVI**, 3-16

Lodish, H.F., und Rothman, J.E. (1979).

"Die Bildung von Zellmembranen."

Spektrum der Wissenschaft **3**, 30-47

Lowry, O.H., Rosebrough, N.V., Farr, A.L., und Randall, R.J. (1951).

"Protein measurement with the folin-phenol reagent."

J. Biol. Chem. **103**, 265-275

Margoliash, E. (1973).

in Proc. Int. Conf. Theor. Phys. Biol. 3rd 1971, 175 ff.

Meyer, D.I., Krause, E., und Dobberstein, B. (1982).

"Secretory protein translocation across membranes - the role of the docking protein."

Nature **297**, 647-650

Michel, R., Wachter, E., und Sebald, W. (1979).

"Synthesis of a larger precursor for the proteolipid subunit of the mitochondrial ATPase complex of *Neurospora crassa* in a cell-free wheat germ system."

FEBS Lett. **101**, 373-376

Mickelson, J.R., Graeser, M.L., und Marsh, B.B. (1980).

"Purification of skeletal-muscle mitochondria by density-gradient centrifugation with Percoll."

Anal. Biochem. **109**, 255-260

Mihara, K., Omura, T., Harano, T., Brenner, S., Fleischer, S., Rajagopalan, K.V., und Blobel, G. (1982).

"Rat liver L-glutamate dehydrogenase, malate dehydrogenase, D-β-hydroxybutyrate dehydrogenase and sulfite oxidase are each synthesized as larger precursors by cytoplasmic free polysomes."

J. Biol. Chem. **257**, 3355-3358

Milstein, C., Brownlee, G.G., und Harrison, T.M. (1972).

"A possible precursor of immunoglobulin light chains."

Nature New Biol. **239**, 117-120

Nörby, J.G., Ottolenghi, P., und Jensen, J. (1980).

"Scatchard Plot: Common misinterpretation of binding experiments."

Anal. Biochem. **102**, 318-320

O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., und O'Farrell P.H. (1977).

"High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acid proteins."

Cell **12**, 1133-1142

Papahadjopoulos, P., Vall, W.J., Jacobsen, K., und Poste, G. (1975).

"Cochleate lipid cylinders: Formation by fusion of unilamellar vesicles."

Biochim. Biophys. Acta **394**, 483-491

- Pelham, Z.R.B., und Jackson, R.J. (1976).
"An efficient mRNA dependent translational system from reticulocyte lysates."
Eur. J. Biochem. **67**, 247-256
- Pfaller, R., Freitag, H., Harmey, M.A., Benz, R., und Neupert, W. (1985).
"A water-soluble form of porin from the mitochondrial outer membrane of *Neurospora crassa*. Properties and relationship to the biosynthetic precursor form."
J. Biol. Chem. **260**, 8188-8193
- Pfanner, N., und Neupert, W. (1985).
"Transport of proteins into mitochondria: A potassium diffusion potential is able to drive the import of ADP/ATP carrier."
EMBO J. **4**, 2819-2825
- Pollet, R.J., Standaert, M.L., und Haase, B.A. (1977).
"Insulin binding to the human lymphocyte receptor. Evaluation of the negative cooperativity model."
J. Biol. Chem. **252**, 5828-5834
- Powell-Jones, C.H.J., Thomas, C.G.Jr., und Nayfeh, S.N. (1980).
"Thyrotropin receptor in normal human thyroid. Nonclassical binding kinetics not explained by the negative cooperativity model."
J. Biol. Chem. **255**, 4001-4010
- Rietveld, A., Sijens, P., Verkleij, A.J., und de Kruijff, B. (1983).
"Interaction of cytochrome c and its precursor apocytochrome c with various phospholipids."
EMBO J. **6**, 907-913
- Rietveld, A., und de Kruijff, B. (1984).
"Is the mitochondrial precursor protein apocytochrome c able to pass a lipid bilayer?"
J. Biol. Chem. **259**, 6704-6707

Rietveld, A., Ponjee, G.A.E., Schiffers, P., Jordi, W., van de Coolwijk, P.J.F.M., Demel, R.A., Marsh, D., und de Kruijff, B. (1985)

Investigation on the insertion of the mitochondrial precursor protein apocytochrome c into model membranes."

Biochim. Biophys. Acta **818**, 398-409

Riezman, H., Hay, R., Witte, C., Nelson, N., und Schatz, G. (1983).

"Yeast mitochondrial outer membrane specifically binds cytoplasmically synthesized precursors of mitochondrial proteins."

EMBO J. **7**, 1113-1118

Rothman, J.E., und Lenard, J. (1977).

"Membrane asymmetry. The nature of membrane asymmetry provides clues to puzzle of how membranes are assembled."

Science **195**, 743-753

Schatz, G., und Mason, T.L. (1974).

"The biosynthesis of mitochondrial proteins."

Ann. Rev. Biochem. **43**, 51-87

Scott, W.A., und Mitchell, H.K. (1969).

"Secondary modification of cytochrome c by *Neurospora crassa*."

Biochemistry **8**, 4282-4289

Schleyer, M., und Neupert, W. (1985).

"Transport of proteins into mitochondria: Translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membrane."

Cell, **43**, 339-350

Schmidt, B., Wachter, E., Sebald, W., und Neupert, W. (1984).

"Processing peptidase of *Neurospora* mitochondria. Two step cleavage of imported ATPase subunit 9."

Eur. J. Biochem. **144**, 581-588

Schmidt, B., Pfaller, R., Pfanner, N., Schleyer, M., und Neupert, W. (1985).

in: Achievements and perspectives in mitochondrial research.

"Transport of proteins into mitochondria: Receptors, recognition and transmembrane movement of precursors."

Quagliariello, E., Slater, E.C., Palmieri, F., Saccone, C., und Kroon, A.M. eds.

Elsevier Publishing Corp., Amsterdam, in Druck

Singer, S.J., und Nicolson, G.L. (1972).

"The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of orientated globular proteins and lipids."

Science **175**, 720-731

Singer, S.J. (1977).

"Thermodynamic the structure of integral membrane proteins, and transport."

J. Supramolec. Struct. **6**, 313-323

Steck, T.L., und Yu, J. (1973),

"Selective solubilization of proteins from red blood cell membranes by protein perturbants."

J. Supramolec. Struct. **1**, 220-232

Tanford, C. (1978).

"The hydrophobic effect and the organisation of living matter."

Science **200**, 1012-1018

Taniuchi, H., Basile, G., Taniuchi, M., und Veloso, D. (1983).

"Evidence for formation of two thioether bonds to link heme to apocytochrome c by partially purified cytochrome c synthetase."

J. Biol. Chem. **258**, 10963-10966

Teintze, M., Slaughter, M., Weiss, H., und Neupert, W. (1982).
"Biogenesis of mitochondrial ubiquinol : cytochrome c reductase
(cytochrome bc₁ complex)."

J. Biol. Chem. **257**, 10364-10371

Timkovich, R. (1979).

in "The Porphyrins" (D. Dolphin, ed.)

Academic Press New York, pp 241ff.

Towbin, H., Staehlin, T., und Gordon, J. (1979).

"Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to
nitrocellulose sheets: Procedure and some applications."

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 4350-4357

Viebrock, A., Perz, A., und Sebald, W. (1982).

"The imported preproteins of the proteolipid subunit of the mitochondrial
ATP synthetase from *Neurospora crassa*. Molecular cloning and sequencing
of the mRNA."

EMBO J. **1**, 565-572

Visco, C., Taniuchi, H., und Berlett, B.S. (1985).

"On the specificity of cytochrome c synthetase in recognition of the
amino acid sequence of apocytochrome c."

J. Biol. Chem. **260**, 6133-6138

Walter, P., und Blobel, G. (1982).

"Signal recognition particle contains a 7 S RNA essential for protein
translocation across the endoplasmic reticulum."

Nature **299**, 691-698

Watanabe, K., und Kubo, S. (1982).

"Mitochondrial adenylate kinase from chicken liver: Purification,
characterization and its cell-free synthesis."

Eur. J. Biochem. **123**, 587-592

- Weiss, H., v.Jagow, G., Klingenberg, M., und Bücher, T. (1970).
"Characterization of *Neurospora crassa* mitochondria prepared with a grind-mill."
Eur. J. Biochem. **14**, 75-82
- Wickner, W. (1980).
"Assembly of proteins into membranes."
Science **210**, 861-868
- Zimmermann, R., Paluch, U., und Neupert, W. (1979a).
"Cell-free synthesis of cytochrome c."
FEBS Lett. **108**, 141-146
- Zimmermann, R., Paluch, U., Spritzl, M., und Neupert, W. (1979b).
"Cell-free synthesis of the mitochondrial ADP/ATP carrier of *Neurospora crassa*."
Eur. J. Biochem. **109**, 217-229
- Zimmermann, R., und Neupert, W. (1980).
"Transport of proteins into mitochondria. Posttranslational transfer of the ADP/ATP carrier into mitochondria *in vitro*."
Eur. J. Biochem. **109**, 219-229
- Zimmermann, R., Hennig, B., und Neupert, W. (1981).
"Different transport pathways of individual precursor proteins in mitochondria."
Eur. J. Biochem. **116**, 455-460
- Zimmermann, R., und Neupert, W. (1983).
"Biosynthesis and assembly of nuclear-coded mitochondrial membrane proteins in *Neurospora crassa*."
Meth. Enzymol. **97**, 275-286

Zwizinski, C., Schleyer, M., und Neupert, W. (1984).

"Proteinaceous receptors for the import of mitochondrial precursor proteins."

J. Biol. Chem. **259**, 7850-7856

Lebenslauf

3.12.1953	geboren in Eschede/Celle als zweiter Sohn des Tierarztes Dr. Helmut Köhler und seiner Ehefrau Elisabeth
1960-1964	Besuch der Volksschule in Eschede
1964-1972	Besuch des humanistischen Gymnasiums in Celle
8.5.1972	Abitur
1972-1974	Wehrdienst als Soldat auf Zeit bei der Bundeswehr
1975-1981	Studium der Biochemie an der Universität Tübingen
30.10.1981	Diplom
seit Ende 1981	Beginn der Doktorarbeit als wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. W. Neupert am Institut für Biochemie der Universität Göttingen
seit Okt. 1983	nach Berufung von Prof. Neupert auf den Lehrstuhl für Physiologische Chemie an der Universität München Fortführung der Arbeit am dortigen Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie

